



---

Einfluss der Anästhetika Propofol und Ketamin sowie der Enantiomere  
Ketamin „r“ und „s“ auf die bakterienstimulierte  
TNF $\alpha$ -Antwort in Leukozyten

**Dissertation**  
**zur Erlangung des akademischen Grades**

**doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich -Schiller-Universität**

**2011**

von Susann Lindner

geboren am 28.04.1981 in Gera

---

## **Gutachter**

- 1.) Herr Prof. Dr. med. Michael Bauer, Jena
- 2.) Frau Dr. med. Amelie Lupp, Jena
- 3.) Frau Prof. Dr. med. Gabriele Nöldge-Schomburg, Rostock

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.01.2012**

## Inhaltsverzeichnis

<b>I. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>II. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1 Überblick über das menschliche Immunsystems.....	4
1.1.1 Spezifische und unspezifische Immunität .....	4
1.2 Perioperatives Immunsystem.....	8
1.2.1 Neurohumorale Stressachse.....	8
1.2.2 Pathogenese und Pathophysiologie der Sepsis.....	11
1.3 Aktivierung des Immunsystems und der einzelnen Zellkomponenten.....	12
1.3.1 Lipopolysaccharide (LPS) .....	13
1.3.2 fMLP als in vitro Modell für Granulozyten.....	14
1.3.3 Zytokine .....	15
1.4 Anästhetika .....	20
1.4.1 Propofol (2,6 Diisopropylphenol) .....	21
1.4.2 Ketamin, Ketamin „r“ und „s“.....	21
1.5 Apoptose .....	23
1.5.1 Morphologische Veränderungen.....	24
1.5.2 Phosphatidylserin.....	25
<b>2. Fragestellung.....</b>	<b>26</b>
<b>3. Material und Methodik .....</b>	<b>27</b>
3.1 Intrazelluläre Zytokinmessung mittels Fluoreszenzzytometrie.....	27
3.1.1 Grundlagen FACS.....	27
3.1.2 Probanden.....	28
3.1.3 Versuchsaufbau.....	29
3.2 Fluoreszenzmikroskopie.....	32
3.2.1 Grundlagen Fluoreszenzmikroskopie.....	32
3.2.2 Probanden.....	34
3.2.3 Versuchsaufbau.....	34
3.3 Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche als Apoptosemarker.....	37

3.3.1 Probanden.....	37
3.3.2 Versuchsaufbau .....	37
3.4. statistische Auswertung.....	39
<b>4. Auswertung .....</b>	<b>40</b>
4.1 Analyse der TNF $\alpha$ -Expression nach Applikation intravenöser Anästhetika in Leukozyten mittels Fluoreszenzzytometrie.....	40
4.1.1 Effekte von Ketamin und Propofol auf die spontane und LPS-stimulierte TNF $\alpha$ -Expression.....	41
4.1.2 Effekte von Ketamin und Propofol auf die spontane und fMLP-stimulierte TNF $\alpha$ -Expression.....	45
4.1.3 Effekte von Ketamin und Propofol auf die spontane und SEB stimulierte TNF $\alpha$ Expression in Lymphozyten.....	48
4.1.4 Effekte des Zusatzstoffes Intralipid auf die spontane und stimulierte TNF $\alpha$ -Expression .....	50
4.1.5 Effekte des Racemats Ketamin im Vergleich zu seinen Enantiomeren Ketamin „r“ und „s“ auf die spontane und stimulierte TNF $\alpha$ -Expression.....	50
4.2 Analyse der TNF $\alpha$ -Expression nach Applikation intravenöser Anästhetika in Leukozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie .....	54
4.2.1 Effekte der Leukozyten auf die spontane und LPS-stimulierte TNF $\alpha$ -Expression.....	54
4.2.2 Effekte von Ketamin und Propofol auf die spontane und LPS-stimulierte TNF $\alpha$ -Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie .....	56
4.3 Effekte intravenöser Anästhetika auf die Apoptose gemessen am Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche .....	59
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>60</b>
5.1 Modelle und Methodik.....	60
5.1.1 Diskussion der Methodik.....	60
5.1.2 verwendete Modelle .....	62
5.2 Anästhesie und Immunsystem.....	64
5.2.1 historische Aspekte.....	64
5.2.2 Einfluss unterschiedlicher Anästhesieverfahren .....	65
5.2.3 differenzierte Effekte auf die einzelnen Komponenten des Immunsystems .....	66
5.2.4 differenzierte Effekte der untersuchten Anästhetika auf das Immunsystems .....	78
5.2.5 Einfluss von Zytokinen auf das Immunsystem im Rahmen einer chirurgischen Intervention .....	84

5.2.6 <i>Anästhesie und Sepsis</i> .....	89
5.2.7 <i>Immunmodulation und Sepsis</i> .....	90
5.3 Synopsis .....	93
<b>VI. Literatur und Quellverzeichnis</b> .....	<b>96</b>
<b>VII. Danksagung</b> .....	<b>119</b>
<b>VIII. Lebenslauf</b> .....	<b>120</b>
<b>IX. Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....	<b>121</b>

## I. Abkürzungsverzeichnis

### A

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
APC	antigenpräsentierende Zelle
APLT	Aminophospholipid Translokase
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrom</i>
ATP	Adenosintriphosphat

### B

BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BD	Becton dickinson

### C

CARS	Compensatory Antiinflammatory Response Syndrom
CGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i>
CoA	Coenzym A
CRH	Corticotrope Releasing Hormon
CSF	costimulierender Faktor

### D

DD	death domains (Todesdomänen)
----	------------------------------

### E

ER	Endoplasmatisches Retikulum
----	-----------------------------

### F

FACS	fluorescens-activated-cell-sorting
FAS-L	Fas Ligand
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FMLP	formyl-methion-leucin-phenylalanin
FPR	formyl peptide receptor
FSC	forward light scatter

### G

GABA	Gammaaminobuttersäure
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt
GF	growth factor

**H**

HF	Herzfrequenz
HLA-DR	human leukocyt antigen class II

**I**

IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRAK	IL-1 Rezeptor assoziierten Kinase
INOS	inducible nitric oxide synthase

**K**

KG	Körpergewicht
----	---------------

**L**

LGL	large granular lymphocytes
LMP	lysosomale Membran- Permeabilisierung
LPB	Lipopolysaccharid- Bindungsprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LSD	Lysergsäurediethylamid

**M**

MAD	mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	mitogen-activated proteinkinase
MD-2	entspricht Lymphocyte antigen 96
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MOV	Multiorganversagen

**N**

NMDA	N- Methyl- D- Aspartat
NOS	NO- Synthase
NNR	Nebennierenrinde

**P**

PAMP	pathogen- associated molecular pattern
PerCP	Peridiniumchlorophyll-Protein
PKC- $\delta$	Proteinkinase C $\delta$
PRR	pattern- recognition receptor
PS	Phosphatidylserin

**R**

ROS	reactive oxygen species
R-PE	R-Phycoerythrin



RT- PCR

Real time- Polymerase Chain Reaction

**S**

SIRS

Systemic Inflammatory Response Syndrom

SNP

single nucleotide polymorphism

SSC

sideward light scatter

**T**

TIVA

total intravenöse Anästhesie

TLR

Toll-like Rezeptor

TNF $\alpha$

Tumor Nekrose Faktor- alpha

TNFR1

Tumor Nekrose Faktor- alpha Rezeptor 1

TRAF-6

TNF Rezeptor assoziierter Faktor 6

**Z**

ZNS

zentrales Nervensystem

## II. Zusammenfassung

Chirurgische Interventionen, perioperativer Stress und die verschiedensten Anästhesieverfahren initiieren einen komplexen Einfluss auf das angeborene unspezifische sowie das erworbene spezifische Immunsystem. Grundsätzlich kann formuliert werden, dass Anästhetika und verschiedenste Anästhesieverfahren über zwei Mechanismen in der Lage sind, die Immunfunktion zu beeinflussen: eine direkte Wirkung auf die einzelnen Komponenten des Immunsystems sowie ein indirekter Effekt über das zentrale Nervensystem, infolge einer Modulation der *neurohumoralen Stressachse*. Zwei essentielle Anästhetika in der Langzeitsedierung auf Intensivstationen sind Propofol und Ketamin. In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung dieser beiden intravenösen Anästhetika auf die TNF $\alpha$ -Expression mit und ohne bakterieller Stimulation in allen Leukozytenpopulationen untersucht. Zur Ergänzung soll die Differenzierung der Wirkung zwischen dem (R)- und (S)-Diasteriomer gegenüber dem Racemat von Ketamin betrachtet werden. Ziel dieses Projektes ist es, den Einsatz von Propofol, Ketamin bzw. seiner Diasteriomere bei der Narkose besser beurteilen zu können. Außerdem sollen Langzeiteffekte auf das Immunsystem insbesondere bei analgosedierten Patienten und eine Immunsuppression als etwaige Nebenwirkung der Anästhetika besser eingeschätzt werden.

Im Vollblutansatz gesunder Probanden wurde mit Hilfe eines durchflusszytometrischen Assays der Gehalt an intrazellulärem TNF $\alpha$  in Leukozyten nach Stimulation mit Endotoxin und fMLP als Maß für die inflammatorische Aktivierbarkeit unter dem Einfluss der Anästhetika Propofol und Ketamin quantifiziert. Zusätzlich wurden die (R)- und (S)-Diasteriomere des Racemat Ketamin separat nach gleichen experimentellen Bedingungen betrachtet. Aufgrund zahlreicher pharmakologischer Differenzen zwischen Ketamin und seinen Enantiomeren, sollen immunmodulatorische Effekte nach bakterieller Stimulation aufgedeckt werden. Mit Hilfe eines zusätzlichen Experimentes ist es mittels Durchflusszytometrie möglich einen eventuellen Einfluss von Anästhetika auf das apoptotische Verhalten vitaler Zellen zu erkennen. Zudem zeigt sich, ob durch die Präparation der Blutprobe massive Zelluntergänge zu verzeichnen sind. Zur Ergänzung unserer Analysen am *fluorescence activated cell sorter* (FACS) sollten mittels Fluoreszenzmikroskopie besonders qualitative Akzente einer Immunsuppression bzw. Stimulation durch die Anästhetika unterstrichen werden.

In unseren Untersuchungen präsentieren die Anästhetika Ketamin und Propofol gerichtete immunmodulatorische Effekte nach bakterieller Stimulation. Auffallend im Vergleich zu älteren Publikationen an isolierten Zelllinien, waren zu vernachlässigende Effekte auf die basale nicht stimulierte spontane Zytokinantwort. Erst nach bakterieller Stimulation supprimiert Ketamin dosisabhängig die TNF $\alpha$ -Akkumulation in Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten. Propofol

hingegen steigert die TNF $\alpha$ -Expression nach zusätzlicher bakterieller Aktivierung des Immunsystems. Deutlich gegensätzliche Effekte der beiden Anästhetika waren jedoch erst unter pharmakologischen Dosierungen signifikant, welche allerdings auf Intensivstationen im Rahmen einer Langzeitanalgesedierung erreicht werden könnten. Trotz der zahlreichen Unterschiede vom Racemat und den Enantiomeren von Ketamin in Pharmakodynamik und Pharmakokinetik zeigten unsere Untersuchungen zur bakteriell stimulierten TNF $\alpha$ -Expression in Leukozyten keine wesentlichen Differenzen. Eine suppressive Modulation nach Stimulation mit bakteriellem Endotoxin war in allen Ketaminen bei zehnfacher Konzentration vor allem in Monozyten eindeutig zu verzeichnen. Weiterhin zeigte sich, dass LPS als charakteristisches Monozyten-Stimulans äquivalent eine ausgeprägte Aktivierung in Granulozyten induzierte. fMLP, welches zur direkten Stimulation von neutrophilen Granulozyten herangezogen wird, zeigte in unseren Untersuchungen bedeutend geringere Effekte auf Granulozyten als LPS. Die induzierte Apoptose in Monozyten und Granulozyten nach Applikation klinischer bzw. pharmakologischer Konzentrationen von Propofol und Ketamin blieb im physiologischen Bereich. Auch eine zusätzliche Stimulation mit bakteriellem Antigen zeigte keinen wesentlichen Einfluss auf die Apoptoserate. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnten bei dieser Arbeit die qualitativ inflammatorische Aktivierbarkeit unter dem Einfluss von bakteriellem Endotoxin innerhalb der verschiedenen Leukozytenpopulation darstellt werden. Jedoch ließ sich kein aussagekräftiges Ergebnis über eine mögliche Modulation der TNF-Expression durch Propofol und Ketamin aufgrund starker Belichtungsartefakte darstellen. Bezüglich der zelltypspezifischen Wirkungen waren die Effekte von Propofol und Ketamin auf Monozyten ausgeprägter als auf Granulozyten und Lymphozyten.

Angesichts der Bedeutung postoperativer Infektionen für Mortalität und Morbidität chirurgischer Patienten ist die Frage der Beeinflussung der Immunfunktion durch Anästhetika und Sedativa von enormer klinischer Bedeutung. Vordergründig zeigt eine ausgeglichene Balance bei schwer kranken Intensivpatienten klinische Relevanz. Durch unzählige Angriffspunkte und jegliche Manipulation am Organismus kommt es schnell zu Dysbalancen, die wiederum Organdysfunktion, Infektionen und ungünstigen Krankheitsverlauf fördern. Die vorliegenden Ergebnisse lassen eine komplexe adversative Modulation der Zytokinantwort durch die bei Langzeitsedierung kritisch kranker Patienten eingesetzten Anästhetika Propofol (proinflammatorisch) und Ketamin mit seinen Diastereomeren (antiinflammatorisch) im kultivierten Vollblutansatz nach bakterieller Stimulation stark vermuten. Es wird jedoch noch zahlreiche intensivierten Studien geben müssen, um ein optimales Management auf Intensivstationen zu erreichen.

## 1 Einleitung

Umwelteinflüsse wechseln kontinuierlich. Aus diesem Grund ist der Schutz eines dynamischen Gleichgewichts der Körperfunktionen eine grundlegende Aufgabe des menschlichen Organismus. Die Aufrechterhaltung der menschlichen Homöostase wird nach heutigem Wissen durch ein fein abgestimmtes Zusammenspiel von Immunzellen, Zytokinen und neuroendokrinen Hormonen ermöglicht. Neben Viren, Bakterien und anderen Pathogenen können auch exogene Faktoren, wie Operationen oder Anästhesieverfahren, dieses wichtige Gleichgewicht stören und zu erheblichen Beeinträchtigungen der Gesundheit führen.

In der heutigen Medizin stellen perioperative Infektionen und Modulationen des Immunsystems durch verschiedene Anästhesieverfahren und chirurgische Interventionen ein zentrales Problem mit hohem Kostenfaktor dar. Diese Sachverhalte werden seit mehreren Jahrzehnten eingehend diskutiert. Bereits 1903 postulierte SNELL aufgrund tierexperimenteller Untersuchungen einen möglichen ungünstigen Einfluss der Anästhetika auf das Immunsystem (Snell et al., 1903). Eine beträchtliche Anzahl von wissenschaftlichen *in vitro*-Untersuchungen an chirurgischen oder kritisch kranken Patienten belegen, dass zahlreiche Analgetika, Sedativa und Anästhetika diverse Komponenten der Immunantwort modifizieren können. Beispielsweise initiieren verschiedene volatile Anästhetika eine Beeinflussung der monozytären Zytokinproduktion (Rossano et al., 1992, Bauer et al 1998). ROSSANO ET AL. konnten eine gesteigerte TNF $\alpha$ -Synthese nach Zugabe von Propofol, Thiopental und Ketamin zu verschiedenen Kulturmedien in einer Studie 1992 erfassen. Die Applikation von Fentanyl in klinisch üblichen Dosen während kleiner chirurgischer Eingriffe bewirkt hingegen durch Blockade der Stressantwort einen hemmender Effekt (Bauer et al., 1998).

Das Abbild der Relevanz *in vivo* ist jedoch weitaus ungeklärter (Galley et al., 2000). Vor allem die kurzzeitige Anwendung der Anästhetika im Rahmen von Operationen ist weitgehend unerforscht. Auch das chirurgische Trauma kann nicht nur lokale Entzündungsreize initiieren, sondern ist in der Lage eine systemische Aktivierung des Immunsystems und des Neuroendokrins zu bewirken.

Zentrales Problem der operativen Intensivmedizin sind hierbei insbesondere die Entstehung eines septischen Krankheitsbildes mit der Gefahr der Entwicklung eines Multiorganversagens (MODS). Ein essentielles Problem mit immunmodulatorischen Effekten in der perioperativen Medizin scheint durch Invasion von Mikroorganismen gegeben zu sein. Pathogene Keime können dabei nicht nur über die chirurgische Wunde eindringen. Die physiologische Barrierefunktion von Haut und Schleimhaut kann zusätzlich durch anästhesiologische und intensivmedizinische Maßnahmen, wie Blasenkatheterisierung, Punktion von Gefäßen und Intubation beeinflusst werden (Bauer et al., 1998). Eine maßgebliche Rolle scheint außerdem die Translokation von Mikroorganismen aus dem Darmlumen einzunehmen. Dabei bilden große abdominalchirurgische Eingriffe (Wang et al 1994),

ein längerer Aufenthalt auf Intensivstation (Donowitz et al., 1982) und intestinale Mangel durchblutung, beispielsweise bei ischämischen Reperfusionsschaden (Horten et al., 1993) und nach Applikation von Medikamenten (Berg et al., 1988), eine Gruppe besonderer Risikofaktoren für dieses Phänomen. Neben Mikroorganismen nimmt der Stellenwert einer inadäquaten Antwort des unspezifischen Immunsystems als weiterer pathogenetischer Faktor zu (Beal et al., 1994; Livingston et al., 1995; Bone et al., 1996). Es resultiert eine generalisierte Entzündungsreaktion, welche nach heutiger Nomenklatur als „SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE SYNDROM“ (SIRS) bezeichnet wird. Somit lässt sich auch die Initiierung eines septischen Bildes nach abakteriellen Traumen, wie Operationen mit extrakorporaler Zirkulation (McBride et al., 1995) oder bei akuter Pankreatitis erklären.

Die Entwicklung von Komplikationen, insbesondere eines MODS unterliegt bei annähernd gleichen Konditionen im Verlauf des intensivmedizinischen Aufenthalts erheblichen interindividuellen Schwankungen. Pathophysiologisch kann dieses Phänomen anhand individueller Faktoren, wie zum Beispiel Polymorphismen im TNF-Promotor, erklärt werden. Zusätzlich dient auch das „TWO HIT“ Modell der Sepsis der Erklärung dieser interindividuellen Differenzen (Kapral et al. 2005). Normalerweise werden Endotoxine sehr häufig über das Splanchnikus-Stromgebiet zur Leber gebracht, ohne dass es zu klinischen Symptomen oder zur Ausschüttung von Zytokinen kommt. Die überschießende Zytokinausschüttung in den Kupffer'schen Sternzellen bei Sepsis könnte einerseits durch die große Menge an stimulierenden Substanzen bedingt sein, andererseits könnte jedoch auch ein Priming dieser Zellen durch ein vorhergehendes Ereignis mit nachfolgender erhöhter Antwort auf einen zweiten Stimulus bestehen (Kapral et al., 2005).

Im Folgenden werden die für diese Arbeit wesentlichen Grundlagen und Wirkmechanismen kurz dargestellt.

## **1.1 Überblick über das menschliche Immunsystems**

### **1.1.1 Spezifische und unspezifische Immunität**

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus zahlreichen zellulären und humoralen Faktoren, die den Organismus in die Lage versetzen, Infektionserreger und andere Fremdstrukturen zu bekämpfen. Die Instrumente dieses Systems sind über den gesamten Organismus mit einer Konzentrierung in den primären (Knochenmark, Thymusdrüse) und sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Schleimhaut, Milz, Haut) verteilt. Die Zahl der immunologisch bedeutsamen Zellen wird auf  $10^{15}$  und das Gewicht auf ca. 2,5kg (Schütt et al., 2004) geschätzt. Um möglichst eine lückenlose Abwehr gegen auftretende Pathogene zu gewährleisten, existieren zwei Abwehrmechanismen (Tab.1), die parallel ablaufen können und sich in Ihrer Wirkung ergänzen:

zum einen ist dies die unspezifische, angeborene Immunität mit einem Repertoire an Zellen und Stoffen, die die erste, frühe Phase der Abwehr von Krankheitserregern bestimmt. Außerdem ein selektiv wirkendes System, das für die antigenspezifische oder adaptive Immunantwort

	UNSPEZIFISCHES IMMUNSYSTEM	SPEZIFISCHES IMMUNSYSTEM
Humorale Komponenten	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Komplement (alternativ)</li> <li>• Lysozym</li> <li>• Akut-Phase-Proteine (CRP)</li> <li>• Fibronektin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Komplement (klassisch)</li> <li>• Immunglobuline der B-Lymphozyten</li> </ul>
Zelluläre Komponenten	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Monozyten, Makrophagen</li> <li>• Dendritische Zellen</li> <li>• Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNL)</li> <li>• Natural killer cells (NKC)</li> <li>• Endothelzellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T- Lymphozyten</li> </ul>
Mechanische Barrieren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Haut</li> <li>• Schleimhaut</li> </ul>	

**Tab.1:** Komponenten des Immunsystems

verantwortlich ist und erst einige Tage später seine Wirkung entfaltet (Hoffmann et al., 1999). Phylogenetisch älter ist das angeborene Immunsystem. Nur Wirbeltiere besitzen darüber hinaus ein erworbenes Abwehrsystem. Die erste Barriere im Falle eines Angriffs auf unseren Körper ist die angeborene unspezifische Immunabwehr.

Man nimmt an, dass 99% aller Infektionen durch dieses beherrscht werden können. In vorderster Front stehen dabei Haut und Schleimhäute. So wird die äußerste Hautschicht fortwährend abgestoßen, was mikrobiellen Keimen die Invasion erschwert. Die Zellen der unspezifischen Immunität kommen nach Eindringen von Fremdstoffen als erstes mit dem Pathogen über *pattern recognition receptors* (PRR) in Kontakt und versuchen durch sezernierte Zytokine weitere Komponenten des Immunsystems zu aktivieren. In diesem System sind klonale Proliferationen überflüssig, da die zugehörigen Immunzellen zunächst PRRs exprimieren. Das systemische Äquivalent der aktivierten unspezifischen Immunabwehr ist die Akut-Phase-Reaktion (humoral), die im Organismus durch Leukozytose, Fieber und erhöhte Gefäßpermeabilität charakterisiert ist. Nach Aufnahme des Fremdstoffes können die Zellen des Monozyten/Makrophagen-Systems Teile des Fremdkörpers auf der Zelloberfläche präsentieren. Sie fungieren dann als antigenpräsentierende Zellen (APCs). Diese können durch weitere zur Phagozytose befähigte Zellen, wie dendritische Zellen, Endothelzellen oder Hepatozyten, unterstützt werden. Die Hepatozyten sind darüber hinaus

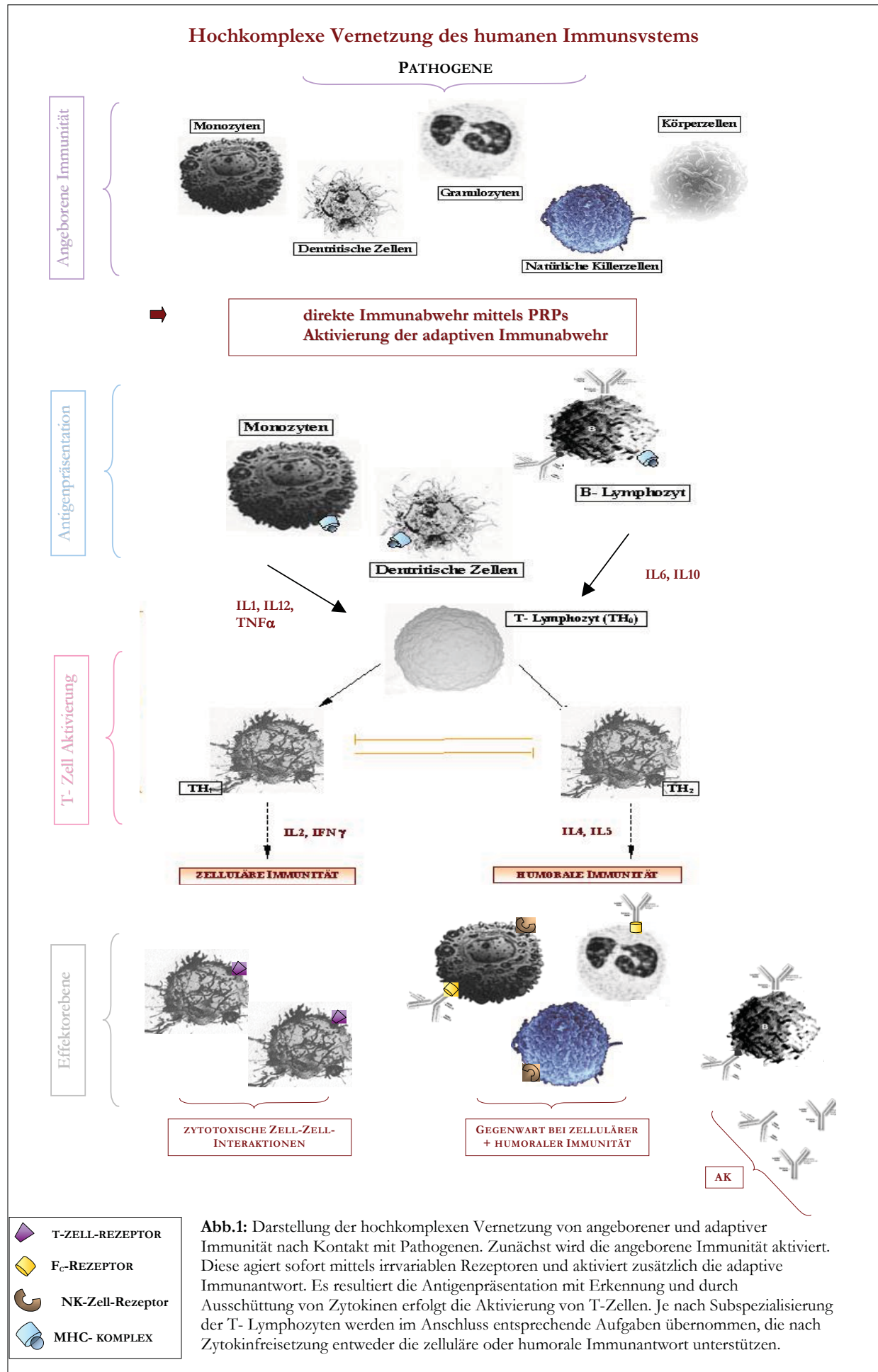
die Produzenten der wichtigsten Komponenten des unspezifischen, humoralen Abwehrsystems. Reicht diese Aktivierung jedoch für eine erfolgreiche Abwehr nicht aus, so z.B. wenn die Beschaffenheit des Fremdanogens das Komplement oder die Phagozyten nicht entsprechend aktiviert, wird das angeborene Immunsystem durch die adaptive, antikörpervermittelte Immunität ergänzt.

Im Gegensatz zum unspezifischen Immunsystem kennzeichnet die erworbene Immunantwort das hochspezifische Erkennen potentieller Antigene, die Fähigkeit zu optimierter Anpassung an körperfremde Strukturen und die Initiierung und Zerstörung von Pathogenen mit Hilfe von angeborenen Immunzellen. Die Effizienz dieser Gegenmaßnahmen verbessert sich durch wiederholte Exposition mit dem gleichen Antigen; es entsteht ein immunologisches Gedächtnis. Die erworbene Immunität basiert auf der Grundlage der klonalen Selektion. Dabei ist die Bindungsstelle eines Antikörpers bereits vor Kontakt mit dem spezifischen Antigen vollständig determiniert. Lediglich die Reproduktion wird durch Antigenkontakt eingeleitet (Schwartz et al., 2003). Nach Kontakt reifer B-Zellen mit ihren entsprechenden Antigenen resultieren Zellteilung, Ausdifferenzierung zu Plasmazellen sowie Sekretion enormer Mengen löslicher Antikörper, die die humorale Immunantwort vermitteln (Affinitätsreifung, somatische Rekombination und Mutation).

Das Immunsystem wird durch ein fein abgestimmtes Zusammenwirken von Immunzellen, Zytokinen und neuroendokrinen Hormonen reguliert. Störungen in diesem komplexen Geflecht können durch unbalancierte Immunreaktionen entweder in einem unkontrollierten Mikrobenwachstum oder in einer generalisierten Entzündung (SIRS) mit Gewebeerstörung und Gefäßveränderungen mit Multiorganversagen münden (Zeni et al., 1997; Buchd et al., 2003). Sepsis spiegelt eine dramatische Dysregulation des Immunsystems wider mit dem Verlust der Fähigkeit, Infektionen zu bekämpfen. Primär wurde Sepsis als eine inadäquate Mobilisation von Abwehrzellen gegen eine überschießende Reaktion beschrieben (Bone et al., 1991). Gegenregulationen führten anschließend zu einem *Compensatory Antiinflammatory Response Syndrom* (CARS), wodurch opportunistische Keime imstande sind, eine lebensbedrohliche Destruktion zu initiieren (Schütt et al., 2004). Aktuell weiß man jedoch, dass unkontrollierte Entzündungsreaktionen auch in Abwesenheit von Mikroorganismen durch Trauma oder Hämorrhagien zum Multiorganversagen und schließlich durch Immunsuppression zur Sepsis führen können (Mahidhara et al., 2000). Zusätzlich können Entzündungsmediatoren eine mitochondriale Dysfunktion verursachen, die die Sauerstoffausnutzung der Zellen einschränkt und somit zum apoptotischen Zelltod führt (Paxian et al., 2003)

Einen zusammenfassenden Überblick über die Vernetzung der einzelnen Komponenten der Immunität versucht Abbildung 1 darzustellen.







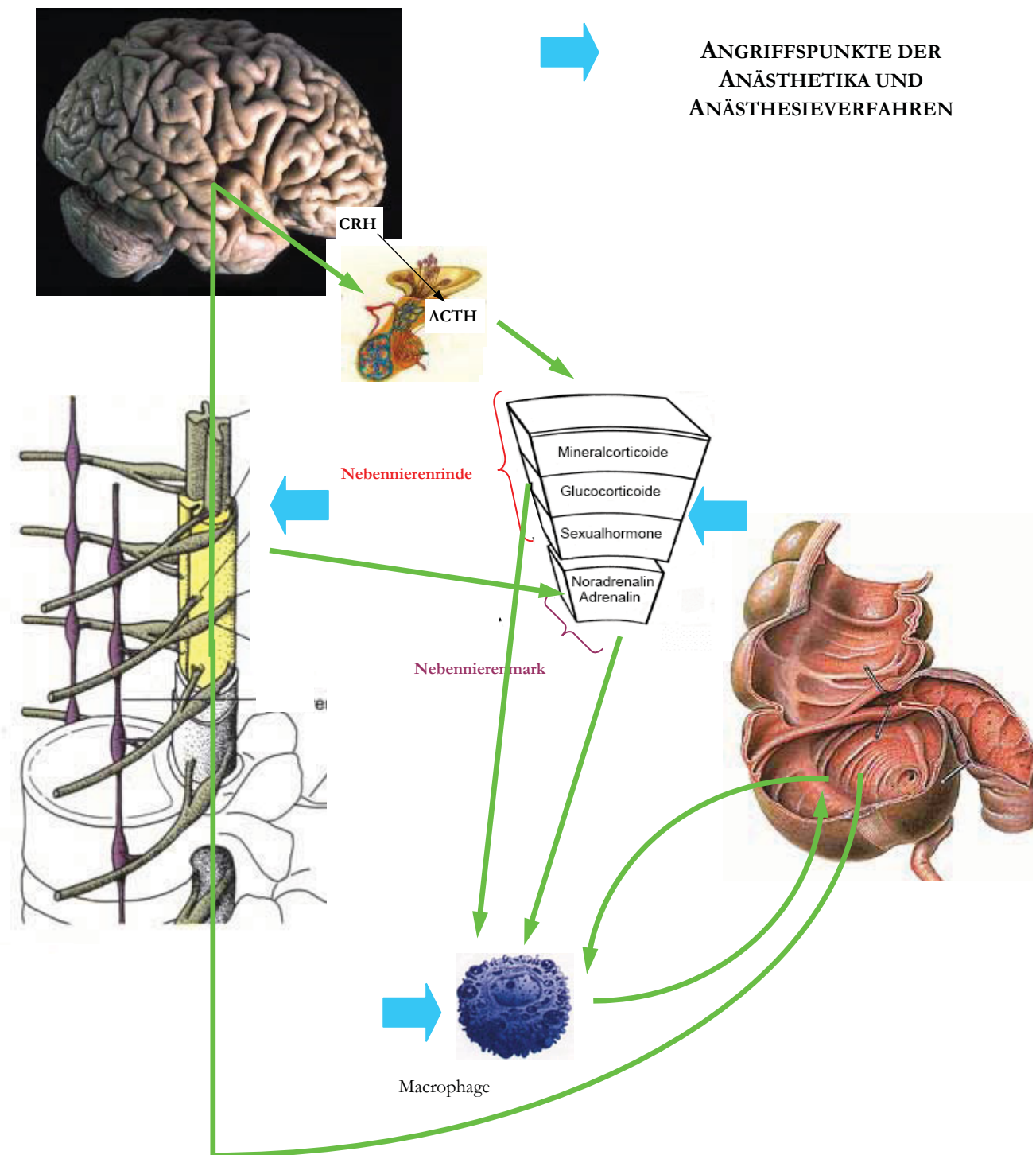
## **1.2 Perioperatives Immunsystem**

Multiple Faktoren können in vielfältigster Weise das Immunsystem perioperativ beeinflussen. Wie bereits einleitend beschrieben können zahlreiche Medikamente modulierend auf die Abwehrfunktionen im Organismus wirken. Auch Mikroorganismen und Hormonmodifikationen sind in der Lage Änderungen des Immunsystems zu initiieren. Die physiologische Barrierefunktion von Haut und Schleimhaut kann dabei zusätzlich durch anästhesiologische und intensivmedizinische Maßnahmen, wie Blasenkatheterisierung, Punktion von Gefäßen und Intubation beeinflusst werden (Bauer et al., 1998). Aktuelle Untersuchungen offenbarten sogar den Einfluss von Stress, Hypoxie und Angst auf die natürlichen Immunfunktionen eines Organismus (Stockmann et al., 2006; Gleeson et al., 2007).

### **1.2.1 Neurohumorale Stressachse**

Es existieren zahlreiche Studien, die einen Zusammenhang zwischen endokriner Stressantwort und einer perioperativen Immunsuppression untersuchen. Aufgrund der Komplexität des Immunsystems und der Vielfalt und Individualität der perioperativen Aktivierungsreaktionen sind die Einflüsse von Operation, endokriner Stressreaktion und Anästhesie oft nicht sicher voneinander abzugrenzen (Kress et al., 1992).

Schmerz, Stress, Angst und eindringende Mikroorganismen aber auch andere perioperative Stressfaktoren wie Hypoxie, Hypovolämie, Azidose und systemische Mediatoren aus dem Wundgebiet haben komplexe Einflüsse auf die Immunantwort, die vielfach durch anästhesiologische Maßnahmen moduliert wird. Unter dem Einfluss dieser Stressreaktion resultiert eine Aktivierung der hypothalamischen-hypophysären Achse. Folglich konnte ein enormer Anstieg der zirkulierenden Katecholaminkonzentration und der Konzentration der Nebennierenrindenhormone verzeichnet werden (Adams et al., 1991). Nach ADAMS ET AL. subsumiert diese perioperative Stressantwort zwei Komponenten: eine akute aktive Phase und eine langsame adaptive Phase. Nach diesem dualen System führt eine Stressreaktion somit zunächst zu einer akuten und aktiven Reaktion, die durch Freisetzung von Katecholaminen und ADH gekennzeichnet ist. Längerfristig ist eine Aktivierung der Adenohypophysen-Nebennierenrinden-Achse zu beobachten, die in einer Toleranz und Anpassung an die Stresssituation resultiert. Interaktionen auf dieser Adenohypophysen-Nebennierenrinden-Achse bewirken die Freisetzung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) durch die Adenohypophyse. Es wird Cortisol aus der Nebennierenrinde mobilisiert (Adams et al., 1991). Hieraus resultiert eine Salz- und Wasserretention. Die Stoffwechsellage ist durch ein überwiegen kataboler Prozesse gekennzeichnet. Dieser Regelkreis und die auf allen Ebenen potentiellen Angriffspunkte für Anästhetika sind in Abb.2 dargestellt.



**Abb. 2:** Systemische Wirkungen des Organismus auf proinflammatorische Stimuli (LPS) aber auch physikalische oder psychogene Faktoren resultieren, innerhalb dieser hypothalamisch-hypophysären-NNR-Achse, initial mit einer Freisetzung von CRH aus den paraventriculären Kernen des Hypothalamus. Dieses bewirkt die Sekretion von ACTH aus der Adenohypophyse, wodurch die NNR Glukokorticoide sezerniert. Glukokorticoide supprimieren Reifung, Differenzierung und Proliferation aller Immunzellen, insbesondere von Makrophagen und Natürlichen Killerzellen (NK). Außerdem reguliert dieser Metabolit die hypothalamisch-hypophysäre-NNR-Achse in Ihrer Gesamtheit runter.

Viele Studien sprechen dafür, dass vor allem in der postoperativen Aufwachphase die Konzentration der Stressparameter durch schnelles Abfluten der Medikamente ansteigt. Dabei gibt es beträchtliche Unterschiede zwischen den einzelnen Anästhesieverfahren (Adams et al., 1991/94).

In verschiedenen *in vivo*-Untersuchungen wurde der Regionalanästhesie im Vergleich zur Vollnarkose ein vermindertes immunmodulatorisches Potential zugeschrieben. Postoperativ reduzierte Serumcortisolspiegel, verminderte IL6-Sekretion und geringer ausgeprägte Immunzell dysbalancen wurden im Vergleich zur Allgemeinanästhesie sowohl bei Epidural- als auch bei Spinalanästhesie beschrieben (Rem et al., 1980; Hole et al., 1982; Hashimoto et al., 1995; Hogevald et al., 2000). Parallel ließ sich zusätzlich eine Reduktion des Noradrenalin spiegels unter periduraler Anästhesie verzeichnen.

Neben Katecholaminen (Van der Pool et al., 1996; Grundmann et al., 2000) und Cortisol (Kutteh et al., 1991) können auch andere Hormone (Geschlechtshormone, Schilddrüsenhormone, Wachstumshormone) der hypothalamischen-hypophysären-adrenergen Achse das Immunsystem in seiner Funktion modulieren und damit eine Störung der Immunkompetenz hervorrufen. Auch ein frühzeitiger Anstieg der Konzentrationen von Wachstumshormonen und Prolaktin (Kelley et al., 1989; Khansari et al., 1990; Matera et al., 1991) mit nachfolgender Suppression dieser Hormone und resultierender Immunsuppression wird diskutiert (Gilbert et al., 1991). Allerdings spielt der Zeitfaktor, d.h. die Dauer des Kontakts dieser Hormone mit immunkompetenten Zellen, eine entscheidende Rolle (Kutteh et al., 1991; Barber et al., 1993).

Ferner sind proinflammatorische Zytokine in der Lage die Sekretion von ACTH zu steigern, wodurch wiederum die Cortisol synthese gefördert wird (Desborough et al., 2000).

Gewebsverletzung und operative Eingriffe führen zu einer komplexen und langanhaltenden Aktivierung des nozizeptiven Systems. Informationsverarbeitung und Signalverarbeitung unterliegen hierbei einer ausgeprägten Modulation und Veränderung, wobei es zu einer erheblichen Verstärkung nozizeptiver Signale kommen kann. Dabei können Anästhetika durch Unterbrechung der afferenten Impulse zum Rückenmark oder durch Blockierung der Weiterleitung auf spinaler Ebene die neurohumorale Stressachse beeinflussen (Bauch et al 2004).

Diese Betrachtungen verdeutlichen, wie vielfältig die Interaktionen und Interferenzen zwischen Immunsystem, Endokrinium und perioperativen Interventionen sein können.

Zentrales Problem dieser perioperativen Modulationen sind hierbei insbesondere die Entstehung eines septischen Krankheitsbildes mit der Gefahr der Entwicklung eines Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS).

### 1.2.2 Pathogenese und Pathophysiologie der Sepsis

Nach heutigen Kenntnissen kommt der Fehlregulation eigentlich protektiver Abwehrsysteme, insbesondere durch inadäquate Reaktion des Immunsystems, für die Keimbeseidlung und die Entwicklung einer Sepsis mit resultierendem Multiorganversagen (MOV) eine primäre Funktion zu (Bauer et al., 1996; Bone et al., 1996; Hack et al., 1997; Hotchkiss et al., 2003). Beinahe 1/3 der beschriebenen Sepsisfälle, die zusätzlich mit Trauma, Schock, Verbrennung und schweren Infektionen einhergehen, enden als Resultat eines MOV jährlich tödlich (Angus et al. 2001).

#### 1.2.2.1 Definition der Sepsis

*„Sepsis ist die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die große biologische Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen“* (Schuster et al. 2005). Dies ist bereits eine moderne Definition von der Arbeitsgruppe SCHUSTER ET AL. aus dem Jahre 2005, welche versucht die feinen Vernetzungen der einzelnen Systeme in der Pathophysiologie des septischen Geschehens zu vereinen. Eine 2009 von FERRER ET AL publizierte Studie legt nahe, dass insbesondere die frühzeitige adäquate Antibiotikagabe und die Infusion von aktiviertem Protein C entscheidende Maßnahmen darstellen (Ferrer et al., 2009). Allgemeine und klassische Erklärungen von SCHOTTMÜLLER ET AL. (1914) stellen jedoch bis zum heutigen Tag eine verbindliche Richtlinie dar. Vielfältigste Vorgänge und Schädigungsmechanismen im Rahmen einer Sepsis machten den Durchbruch einer einzigen Definition sehr schwer.

Die aktuellsten deutschen Leitlinien stammen aus dem Jahre 2010, die nunmehr Empfehlungen für nahezu alle Standardtherapiemaßnahmen bei einem Intensivpatienten anbietet (Reinhart et al., 2010).

#### 1.2.2.2 Immunzellfunktionen im septischen Geschehen

Physiologischerweise reguliert der Organismus die Entzündungsantwort durch eine ausgeglichene Sekretion von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren. Während einer Sepsis kommt es zu einer Fehlfunktion dieser körpereigenen Regulationskapazität (*host defense failure*). Zunächst wurde eine inadäquate Aktivierung der proinflammatorischen Zytokinantwort als pathogenetisch bedeutsam für die generalisierte Entzündungsreaktion bei Sepsis betrachtet. Zur Zeit summieren sich Hinweise darauf, dass vor allem durch die späte Ausschüttung antiinflammatorischer Mediatoren die systemische Entzündung induziert wird. Die Aktivierung des Immunsystems bei Sepsis kann somit als biphasische Störung aufgefasst werden (Riedemann et al., 2003).

Die frühe, hyperdynamische Phase ist charakterisiert durch eine Zunahme des Herzzeitvolumens, einer gesteigerten Gewebepерmeabilität und einer verminderten Gefäßresistenz. Das Kennzeichen dieser Phase ist der proinflammatorische Zustand, die hauptsächlich durch bakteriell stimulierte Neutrophile, Monozyten und Makrophagen gewährleistet wird. Diese Stimulation korreliert mit einer gleichzeitigen Zunahme diverser Zytokine, z.B.  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL1}\beta$ ,  $\text{IL6}$ ,  $\text{IL8}$  und  $\text{IL10}$  (Pinski et al., 1993; Gardlund et al., 1995; Marchant et al., 1995; Hotchkiss et al., 2003; Schmidt et al., 2010). Hierbei besteht eine Wechselbeziehung der Inflammationskaskade mit der Aktivierung des Gerinnungssystems bei Sepsis. So kann einerseits die Aktivierung des Immunsystems zu einer pathologischen Gerinnungsaktivität führen, andererseits kann eine überschießende Gerinnung proinflammatorische Effekte induzieren und amplifizieren (Bernard et al., 2001; Esmon et al., 2004). Eine spätere hypodynamische Phase wird durch eine Abnahme der Gewebe- und Mikrozirkulation eingeleitet, die in einer zunehmenden Schädigung und Dysfunktion einzelner Organe resultiert. In dieser Phase bietet das Immunsystem eine mangelhafte Antigenpräsentation, eine abnehmende HLA-DR-Expression auf Monozyten, einen Verlust der Phagozytosefähigkeit (Meakins et al., 1977; Pietsch et al., 1977; Volk et al., 1996; Klava et al., 1997) und eine verminderte Freisetzung von Zytokinen aus T-Helfer-Zellen (Ayala et al., 2003). Der Verlauf dieser fulminanten antiinflammatorischen Phase bestimmt das *Outcome* kritisch kranker Patienten (Meakins et al., 1977; Oberholzer et al., 2001, Hotchkiss et al., 2003).

Eine Vielzahl von experimentellen Untersuchungen legen dar, dass speziell dysregulierte Apoptose in Immunzellen einen entscheidenden Beitrag zur Immundysfunktion im MOV leisten kann (Ayala et al., 1998; Hotchkiss et al., 1999; Chung et al., 2001; Chung et al., 2003). Anreiz zur Apoptose geben dabei Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL1}$  und  $\text{IL6}$ , Sauerstoffradikale und zytotoxische T-Zellen (Roth et al., 2004).

### **1.3 Aktivierung des Immunsystems und der einzelnen Zellkomponenten**

Ein zentrales Problem in der Aktivierung der angeborenen Immunität stellt die Abgrenzung sehr vielfältiger potentiell pathogener Muster von körpereigenen Strukturen durch eine nur begrenzte Anzahl von Erkennungsmustern dar. Die Fähigkeit der Erreger zur Mutation trägt zur Komplexität dieses Sachverhaltes bei.

Mittels eines evolutionären Selektions- und Entwicklungsprozess spezieller Rezeptoren, die bestimmte konservierte Muster von Pathogenen erkennen und somit die Entstehung einer immunologischen Antwort maßgeblich entscheiden (Medzhitov et al., 2000; Janeway et al., 2002), konnte dieses Problem bewerkstelligt werden. Diese molekularen Strukturen, welche vom angeborenem Immunsystem erkannt werden, bezeichnet man als *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs) (Janeway et al., 1998). PAMPs sind für das Überleben der Mikroorganismen essentiell



(Schütt et al., 2004). Somit bleibt garantiert, dass den Rezeptoren mutierende Keime nicht entgehen können. Korrespondierende Rezeptoren auf den entsprechenden Immunzellen, die in der Lage sind PAMPs in der frühen Phase der Immunantwort zu erkennen, werden unter dem Begriff *pattern-recognition receptors* (PRRs) zusammengefasst. Das Repertoire an Rezeptoren ist beträchtlich und kann sowohl endogenen als auch exogenen Ursprung aufzeigen (Gordon et al., 1999).

### 1.3.1 Lipopolysaccharide (LPS)

Eines der am besten untersuchtesten PAMPs ist LPS, auch bekannt als Endotoxin. LPS ist ein potentes Antigen (Abb. 3/4 als schematische Darstellung). Haupteffektorzellen, die aktiviert werden, sind Monozyten. In zahlreichen Studien wurde nach den genauen molekularen Mechanismen der

zellulären LPS-Erkennung gesucht.

Wichtige

Erkenntnisse für das

Verständnis der

LPS-Effekte brachte

die Entdeckung des

*lipopolysaccharid-*

*binding protein* (LPB)

und des

Zelloberflächen-

Proteins CD14 (Wright et al., 1990). CD14 aktiviert als essentieller Co- Rezeptor, LPS-vermittelt vor allem Makrophagen und initiiert Apoptose (Devit et al., 1998). Im Organismus existiert CD14 in zwei Formen, einerseits als membranständiger Glykophosphatidylinositol-verankerter Rezeptor, andererseits als lösliches Protein.

Membrangebundener CD14-Rezeptor, an den der Komplex aus LPS und LBP bindet, ist mit einem Toll- like Rezeptor (TLR) vereinigt. TLRs besitzen eine extensive Ligandenspezifität für bakterielle Proteine, Pilze und Hefen (Aderem et al., 2000; Vasselon et al., 2002). TLR 4 wurde als kompatibler Rezeptor für LPS identifiziert (Takeuchi et al., 1999).

Eine nachfolgende Aktivierung der Zelle führt zur Ausschüttung früher proinflammatorischer Zytokine, insbesondere von  $\text{TNF-}\alpha$  und IL-1. Diese initiieren ihrerseits die Synthese weiterer distaler Zytokine wie IL-6, IL-8 und IL-10 mit vielfältigen, teils gegensinnigen Wirkungen (Bauer et al., 1998), Lipidmediatoren und reaktiven Sauerstoffradikalen (Dinarello et al., 1997). Zu den Wirkungen dieser Zytokine gehört neben der Unterhaltung der Akutphasereaktion (IL-6) auch eine

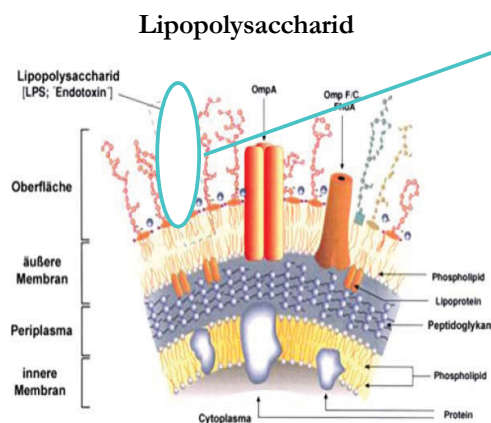


Abb.3: Schematische Darstellung der Zellmembran gramnegativer Bakterien mit LPS

Quelle: Max-Planck-Institut für Immunologie, www.mpi.de (modifiziert)

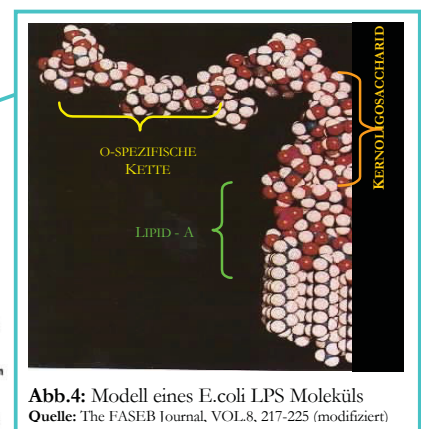


Abb.4: Modell eines E.coli LPS Moleküls

Quelle: The FASEB Journal, VOL.8, 217-225 (modifiziert)

antiinflammatorische Wirkung (IL-10), die das frühe proinflammatorische Signal der Makrophagen beendet (Grundmann et al., 2000).

CD-14 negative Zellen, wie Fibroblasten, glatte Muskelzellen und dendritische Zelle sind durch Interaktionen mit diesem löslichen CD14-Rezeptor trotzdem in der Lage auf LPS zu reagieren. Lösliches CD14 ist im Serum gesunder Individuen nachweisbar, im septischen Geschehen steigen diese Spiegel enorm (Landmann et al 1995)

Gram-positive Bakterien besitzen kein Endotoxin. Ihre Zellmembran besteht aus Peptidoglykan und Lipoteichonsäure, die ebenfalls biologische Aktivität aufweisen (Majcherczyk et al., 1999; Morath et al., 2001). Beide strukturellen Komponenten binden an PRRs, allerdings mit einer weitaus geringeren Effektivität als LPS (Wang et al., 2000). Ein wichtiges Charakteristikum gram-positiver Bakterien ist zudem die Produktion von Exotoxinen. Exotoxine stellen Superantigene dar, die willkürlich an MHC II-Moleküle und T-Lymphozyten Rezeptoren binden. Durch diese Fähigkeit werden T-Zellen aktiviert und zahlreiche proinflammatorische Lymphokine freigesetzt, die einen septischen Schock auslösen können (Lavole et al., 1999). LPS dient in der vorliegenden Dissertation zur Aktivierung der Monozyten, der Schlüsselzellen des unspezifischen Immunsystems.

### 1.3.2 fMLP als *in vitro* Modell für Granulozyten

fMLP ist ein natürliches Bakterienerzeugnis (z.B. aus *Escherichia coli*) (Maracso et al., 1984), welches direkt Chemotaxis und Leukozytenmigration zum Ort der Bakterieninvasion induziert (Niedel et al., 1979). fMLP stimuliert dabei konzentrationsabhängig die Degranulation neutrophiler Granulozyten, die Produktion reaktiver Oxidantien (Kinley et al., 1996) und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Zellen des Immunsystems (hohe Konzentration). Außerdem führt es im Bereich niedriger Konzentration zu Modifikationen im Zytoskelett der Zelle und zur Aktivierung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten (Boxio et al., 2005).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind drei fMLP- Rezeptoren (FPR1, FPR2 und FPR3) identifiziert, wobei fMLP selektiv FPR1 und FPR2 aktiviert. Die Wirkung auf FPR3 ist noch unbekannt. FPR1 befindet sich auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten (Bengis-Garber et al., 1991). FPR2 wird allein auf neutrophilen Granulozyten exprimiert, weist eine 69% Homologität zum FPR1 auf und scheint eine 1000-fach höhere Affinität zu fMLP zu besitzen.

In einem als *oxidative burst* bezeichneten Prozess erzeugen Granulozyten toxische Sauerstoff-Radikale, auch bezeichnet als *reactive oxygen species* (ROS) (Weiß et al., 1986, Dahlgren et al., 1999, Babior et al., 1999), die bakterizid wirken. Diese resultieren im oxidativen Stress, wenn die Produktion von ROS die antioxidativen Abwehrmechanismen überwindet. Oxidativer Stress ist an der Pathophysiologie vieler humaner Stoffwechselprozesse, wie Ischämie, Reperfusion, Entzündung und Sepsis beteiligt (Goode et al., 1993; Murphy et al., 1998; Toyokuni et al., 1999; Cuzzocrea et al.,

2001; Kruidenier et al., 2002). ROS sind potentiell toxisch. Das initiale Produkt ist hierbei Superoxid (Dahlgren et al., 1999), das spontan in  $H_2O_2$  dissoziiert. Aus  $H_2O_2$  generieren daraufhin Hydroxylradikale und andere toxisch wirkende Substanzen.

Diese gebildeten  $O_2$ -Metabolite stellen einerseits ein potentes Defensivsystem gegen zelluläre Antigene dar, führen andererseits jedoch auch zur Membrandestruktion (Delano et al., 1997, Thannickal et al., 2000) an primär nicht verletzten Organen im generalisierten Geschehen der Sepsis. Außerdem rekrutieren sie weitere Leukozyten, die unabhängig von der Endotheladhäsion die Gefäßpermeabilität steigern, und somit eine Gewebedestruktion fördern. Zahlreiche Untersuchungen konnten beweisen, dass diese freien Radikale essentielle Mediatoren in humaner und tierisch induzierter Sepsis darstellen (Goode et al., 1993; Cuzzocrea et al., 2002; Albuszies et al., 2003). ROS, die während einer Sepsis generiert werden, tragen entscheidend zur Destruktion von Endothelzellen aber auch hepatischen und pulmonalen Gewebe bei. Außerdem fördern sie die myokardiale Dysfunktion, DNA- und Zellschäden (Goode et al., 1993; Groeneveld et al., 2000).

Außerdem ist fMLP in der Lage die Apoptose einzuleiten (Nakagawa et al., 2000; Oyadomari et al., 2004). Neutrophile weisen eine sehr verzögerte spontane Aktivierung auf, können jedoch nach Stimulation mit fMLP eine enorme Aktivität entwickeln. Diese induzierte Migration ist nicht nur durch eine Zunahme der aktivierten Zellen gekennzeichnet, sondern auch durch einen Anstieg in Frequenz, Dauer und Schnelligkeit (Entschladen et al., 2000).

Aufgrund der direkten Provozierbarkeit sekretorischer und chemotaktischer Reaktionen in Granulozyten dient es in der vorliegenden Arbeit vordergründig als Stimulus dieser Zellpopulation.

### 1.3.3 Zytokine

Das koordinierte Zusammenwirken der verschiedenen Immunzellen mit den einzelnen Komponenten des Immunsystems wird durch eine Gruppe von löslichen Faktoren, den Zytokinen, ermöglicht. Dabei handelt es sich um pluripotente Polypeptide, mit einem Molekulargewicht von etwa 15-25 kDa, zum Beispiel aus Fibroblasten, Immunzellen, Epithel- und Synovialzellen. Sie vermitteln hochspezifisch und hochpotent sowohl zwischen einzelnen Immunzellen als auch zwischen Immunzellen und Gewebszellen. Sie spielen in der Zell-Zell-Kommunikation eine bedeutende Rolle und können Dauer und Intensität einer Immunantwort beeinflussen. Hochaffine Rezeptoren sind für die Transduktion eines Zytokinsignals in das Zellinnere und somit für die Induktion der biologischen Wirkung verantwortlich. Diese Interaktionen aktivieren Signaltransduktionskaskaden mittels Tyrosin- oder Serinphosphorylierung, wodurch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren resultiert. Diese führen zur Modulation von Genprodukten auf DNA Ebene. Ihr Wirkungsspektrum umfasst neben der Regulation von Immun- und



Entzündungsreaktionen auch die Steuerung von Stoffwechselaktivität, Zelldifferenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose.

Ein essentielles Zytokin mit bedeutender Rolle im septischen Geschehen stellt der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) dar, dem auch in unseren experimentellen Untersuchungen eine zentrale Bedeutung zukommt.

### 1.3.3.1 Tumor Nekrose- Faktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

Ursprünglich wurde TNF $\alpha$  als Substanz bei der antitumoralen Immunantwort, bereits vor etwa 100 Jahren von WILLIAM B. COLEY beschrieben (Wajant et al., 2003). Benannt als TNF $\alpha$  wurde das dafür verantwortliche lösliche Zytokin jedoch erst 1975 von CARSWELL. (Carswell et al., 1975).

Der TNF-Genlocus umfasst TNF $\alpha$  (Lymphotoxin  $\alpha$ ) und TNF $\beta$  (Lymphotoxin  $\beta$ ) und ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 lokalisiert.

Es sind bereits mehrere Polymorphismen des TNF-Genlocus identifiziert worden. Dieser wichtige Sachverhalt und die Assoziation zu kritisch kranken Patienten wird in einem gesonderten Abschnitt dargelegt.

#### 1.3.3.1.1 *Zelluläre Wirkungen*

Das Spektrum der zellulären TNF $\alpha$ -Wirkungen ist ausgesprochen multifunktional und abhängig vom Zelltyp und der Konzentration (Tracey et al., 1989; Yoshiaki et al., 1992). Dabei kann es sich um aktivierende, proinflammatorische oder apoptotische Effekte handeln (Ashkenazi et al., 1999; Wallach et al. 1999).

#### 1.3.3.1.2 *Pathophysiologie und Rezeptoren*

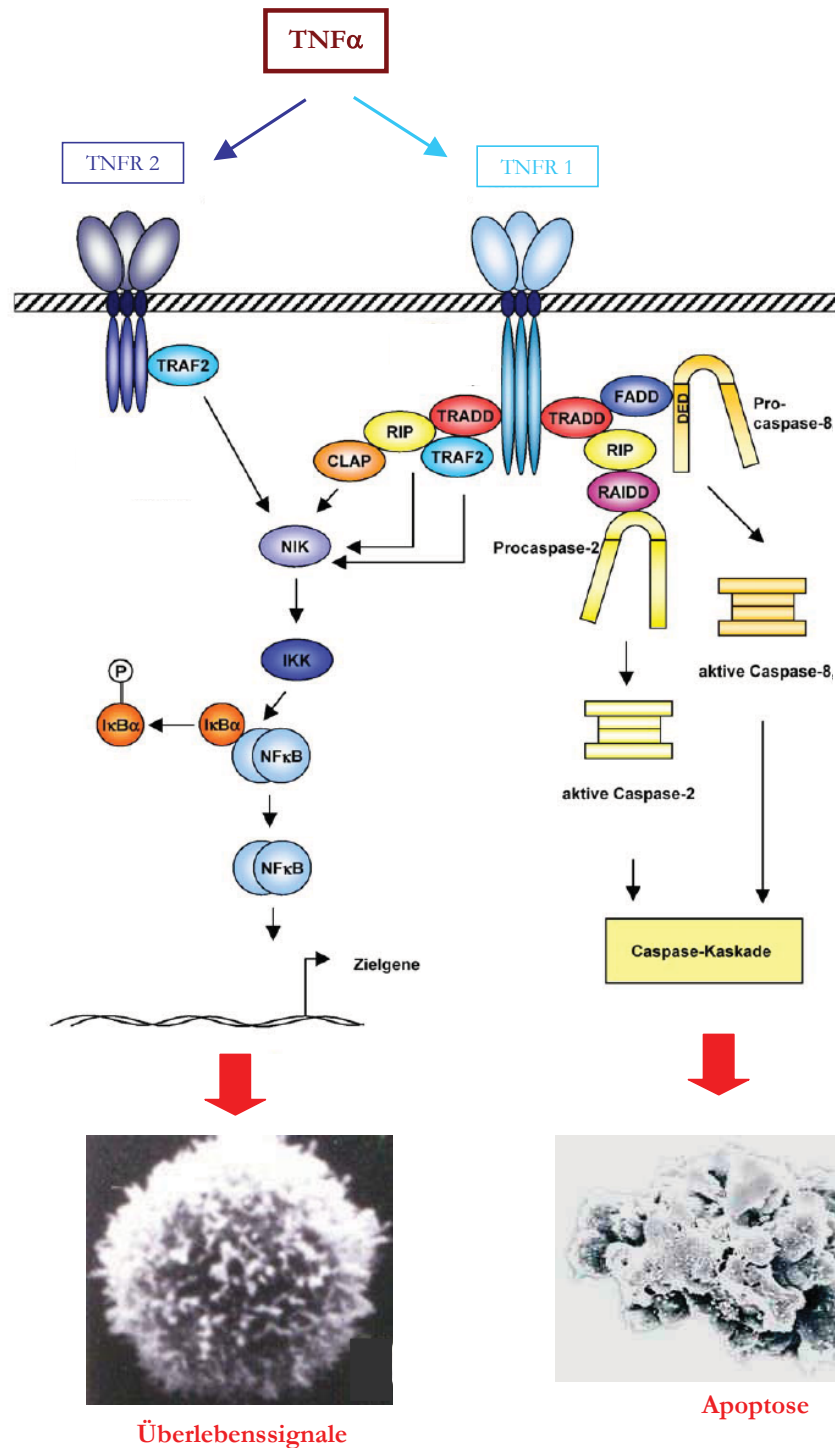
Wie bereits erwähnt kann TNF $\alpha$  neben der Induktion von Apoptose auch Überlebenssignale in der Zelle induzieren (Baker et al., 1998, Ashkenazi et al., 1999; Wallach et al. 1999). Beide, eigentlich gegensätzlichen Funktionen, werden durch Bindung an die beiden TNF-Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, initiiert. Darüber, wie derselbe Stimulus einerseits apoptotische und andererseits anti-apoptotische Mechanismen auslöst und wenn die Homöostase zu einer der beiden Seiten verschoben wird, ist bisher wenig bekannt. Jedoch deutet die Tatsache, dass sich viele Zelltypen resistent gegenüber TNF $\alpha$ -induzierter Apoptose verhalten auf eine zellspezifische Ausprägung der Balance zwischen Todes- und Überlebenssignalen hin. Geraten jedoch die pro- oder antiinflammatorischen Reaktionen aus einem schützenden Gleichgewicht, ist besonders TNF $\alpha$  ein wesentlicher Mediator der Verbrauchskoagulopathie und des Multiorganversagens.

Die zwei TNF $\alpha$ -Rezeptoren TNF-R1 (50kDa, p55) und TNF-R2 (130kDa, p75), werden unabhängig voneinander auf fast allen Körperzellen exprimiert (Lewis et al., 1991; Tartaglia et al., 1992; Vandenabeele et al., 2002; Wajant et al., 2003). Die Homotrimere von TNF $\alpha$  binden an die beiden Rezeptoren mit vergleichbarer Affinität. In den meisten Geweben wird TNF-R1 konstitutiv synthetisiert. Ausnahmen bilden dabei Erythrozyten und ruhende T-Lymphozyten. Im Gegensatz dazu ist die Expression von TNF-R2 stark durch Zytokine reguliert und typischerweise auf Zellen des Immunsystems beschränkt (Lung et al., 2001; Bette et al., 2003; Wajant et al., 2003). Nach Aktivierung durch ein TNF $\alpha$ -Molekül potenziert TNF-R2 zwar die TNF-R1-Wirkung (ligand passing) und reguliert die biologische TNF $\alpha$ -Aktivität auf lokaler Ebene, die Bindung von TNF $\alpha$  an TNF-R2 hat aber intermediären Charakter. Durch die Bindung an TNFR2 wird das TNF $\alpha$ -Molekül nicht neutralisiert, sondern kann nach Dissoziation aus dem Rezeptorkomplex wieder seine biologische Aktivität entfalten (Yoshiaki et al., 1992).

Die Regulation der Rezeptorexpression wird durch zahlreiche Signale, wie Zytokine und Enzymaktivatoren, modifiziert. Auch TNF $\alpha$  selbst reguliert seine Rezeptoren (Vandenabeele et al., 1995; Millet et al., 1997). Im Folgenden werden die Möglichkeiten der Signaltransduktion über die TNF-Rezeptoren in der Abbildung 5 näher erläutert.

Neben membranständigen Rezeptoren entstehen durch proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domänen zellständiger Rezeptoren, TNF $\alpha$ -bindende Proteine (TBPI), die als lösliche TNF-Rezeptoren bezeichnet werden (Tan et al., 1993). Diese löslichen Rezeptormoleküle sind im Blut immer im Überschuss zum TNF $\alpha$  nachweisbar (Aggarwal et al., 1996). BROCKHAUS und KSONTINI befanden zwar, dass die physiologische Bedeutung der löslichen TNF-Rezeptoren noch nicht endgültig zu definieren ist (Brockhaus et al., 1997; Ksontini et al., 1998). Sie spielen jedoch in einem generalisiert septischen Geschehen mit erhöhter proteolytischer Freisetzung als physiologisch antiinflammatorische Komponente eine entscheidende regulative Rolle für die biologische TNF-Aktivität (Tan et al., 1993).

Studien durch PAPATHANASSOGLU ET AL. und DE FREITAGS ET AL. belegen, dass erhöhte Serumspiegel der Rezeptoren TNFR1 direkt mit dem MOF und der schweren Sepsis korrelieren. Verstorbene Septiker hatten dabei sogar bedeutsam höhere Werte als Überlebende (Papathanassoglou et al., 2003; de Freitas et al., 2004).



**Abb.5: pro- und antiinflammatorische Signalwege des TNFα**

TNF-R1 wird konstitutiv synthetisiert. Nach Bindung von TNFα an den TNF-R1 werden über eine komplexe Reaktionskaskade sowohl apoptotische als auch antiapoptotische Mechanismen ausgelöst. Die Expression von TNF-R2 wird durch Zytokine reguliert und findet sich auf Zellen des Immunsystems. Einerseits potenziert es nach Aktivierung die Wirkung des TNF-R1. Andererseits führt es über eine umfangreiche Reaktionskaskade zur Entfaltung seiner biologischen Aktivität.

#### 1.3.3.1.3 Genetische Polymorphismen

Sepsis als komplexes polygenetisches Syndrom, das durch eine unkontrollierte systemische inflammatorische Immunantwort mit anschließender Immunparalyse charakterisiert ist. Als Prädisposition für septische Komplikationen gelten genetische Faktoren, wie Polymorphismen von Genen, die mit einer Modulation der Wirtsantwort einhergehen (Stüber et al., 2001). Zahlreiche klinische Studien haben gezeigt, dass genetischer Polymorphismus und die resultierende Immunantwort auf Infektionen mit dem klinischen Outcome kritisch kranker Patienten assoziiert sind. Diese Untersuchungen implizieren die Pathogenese der Sepsis und Organdysfunktion mit der Vernetzung von Polymorphismen in essentiellen Genen. Die quantitativ häufigste Fraktion genetischer Variationen wird von den *single nucleotide polymorphism* (SPN) gebildet (Brooks et al., 1999, Wjst et al., 2004). Konsekutiv sind Aberrationen im Genom imstande die Immunantwort auf Infektionen so zu manipulieren, dass klinisch relevante Veränderungen im Outcome kritisch kranker Patienten entstehen können.

Auch proinflammatorische Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  unterliegen genetischen Modulationen. Bereits im Jahre 1991 beobachtete man in Familien-basierten Studien, dass die Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  interindividuell und hauptsächlich genetisch determiniert wird (Molvig et al., 1991; Westendorp et al., 1997; Freeman et al., 2000). Bis heute wurden drei *single nucleotide polymorphism* (SNP) in der Promotorregion des  $\text{TNF}\alpha$ -Moleküls identifiziert (308 G-A; 376 G-A; 238 G-A) (Knight et al., 1999; Wunderink et al., 2002).

Nach diesen Erkenntnissen erforschten viele Arbeiten die Rolle des  $\text{TNF}\alpha$ -308-Promotor Polymorphismus in kritisch kranken Patienten. MIRA ET AL. postulierten hierbei bei Patienten im septischen Schock eine signifikante Präsenz dieser genetischen Aberration im Promotor. Außerdem beschrieb diese Studie eine 3,7-fach erhöhte Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mira et al., 1999). Studien von NADEL ET AL. und TANG ET AL. unterstützen diese Aussagen (Nadel et al., 1996/2000; Tang et al., 2000). Andere Studien konnten diese Behauptungen nicht belegen, wodurch es schwierig ist eine Signifikanz dieses Polymorphismus in der Pathogenese der Sepsis zu postulieren. Weitere Polymorphismen in der Promotorregion, wie zum Beispiel -376 G-A, wurden in klinischen Untersuchungen vor allem bei Patienten entdeckt, die im septischen Schock verstarben (Mira et al., 1999).

Die Tabelle 2 fasst die derzeit relevanten Erkenntnisse zwischen genetischen Abberationen im  $\text{TNF}\alpha$  Molekül und Sepsis assoziierten Veränderungen zusammen.

Poly-morphismus	Lokalisation	Allel Frequenz	Funktionelle Studien	Sepsis assoziierte Studien
G-308A	Promotor	18%	<b>1.)</b> Signifikanter Anstieg von TNF $\alpha$ nach Stimulation mit LPS im Vollblut  <b>2.)</b> 6-fache Erhöhung der TNF $\alpha$ -Transkription	<b>1.)</b> gesteigerte Anfälligkeit für septischen Schock und 3,7-fach erhöhte Mortalität  <b>2.)</b> assoziiert mit tödlichem Ausgang bei Meningo-kokkensepsis  <b>3.)</b> postoperatives Risiko und Mortalität für Sepsis erhöht
G-276A	Promotor	5%		Allel nur in Verstorbenen mit septischen Schock identifiziert
G-238A	Promotor	11%		Risiko für Mortalität an Pneumonie gesteigert

**Tab.2:** relevante genetische Abberationen im TNF $\alpha$  Molekül und Sepsis assoziierten Modifikationen

## 1.4 Anästhetika

Bereits 1903 postulierte SNELL aufgrund tierexperimenteller Untersuchungen einen möglichen ungünstigen Einfluss der Anästhetika auf das Immunsystem (Snell 1903). Aktuelle Untersuchungen zeigen deutliche Modulationen der körpereigenen Immunantwort infolge anästhesiologischer und operativer Interventionen auf diversen Ebenen. Eine beträchtliche Anzahl von wissenschaftlichen *in vitro* Untersuchungen an chirurgischen oder kritisch kranken Patienten belegen, dass zahlreiche Analgetika, Sedativa und Anästhetika diverse Komponenten der Immunantwort modifizieren können (Kress et al., 1992; Bauer et al., 1998). Das Abbild der Relevanz *in vivo* ist jedoch weitaus ungeklärter (Galley et al., 2000).

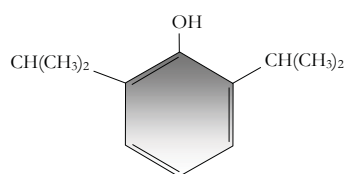
Die Ausschaltung operativ bedingter Schmerzen mit Hilfe der Narkose gehört zu den bedeutendsten Entdeckungen in der Medizin. Anästhesie ist eine durch Medikamente hervorgerufene reversible Funktionseinschränkung des zentralen Nervensystems, durch die eine anterograde Amnesie und Analgesie resultiert. Zur allgemeinen Bewusstseinsausschaltung stehen verschiedene Arten von volatilen und intravenösen Anästhetika zur Verfügung.

Anstelle der systemischen Gabe von Analgetika können auch regionale Anästhesieverfahren angewendet werden, bei denen Lokalanästhetika die Schmerzleitung lokal unterbrechen.

Aufgrund der scheinbar adversativen Effekte von Ketamin (antiinflammatorisch) und Propofol (proinflammatorisch) auf die Transkription des TNF $\alpha$ -Gens und der damit verbundenen perioperativen Beeinflussung des Immunsystems (Hoff et al., 2001) wurden für unsere Analysen diese beiden intravenösen Anästhetika ausgewählt, um komplexe Zytokinmodulationen nach

Kontakt mit infektiösen Stimuli zu untersuchen. Im folgenden Kapitel werden diese Anästhetika kurz in ihren pharmakologischen Eigenschaften vorgestellt.

### 1.4.1 Propofol (2,6 Diisopropylphenol)



2,6 Diisopropylphenol

**Abb 6:** chemische Strukturformel von Propofol

Propofol ist eine chemische Substanz aus der Gruppe der *Alkylphenole* (Abb.6). Mittels einer phenolischen Hydroxylgruppe in der Strukturformel, stellt Propofol ein potentes Antioxidans mit zusätzlicher inhibitorischer Komponente in der Lipidperoxidation dar (Murphy et al., 1992). Die Darreichung dieser Substanz erfolgt aufgrund hoher Lipophilie in einer Emulsion aus Sojamilch,

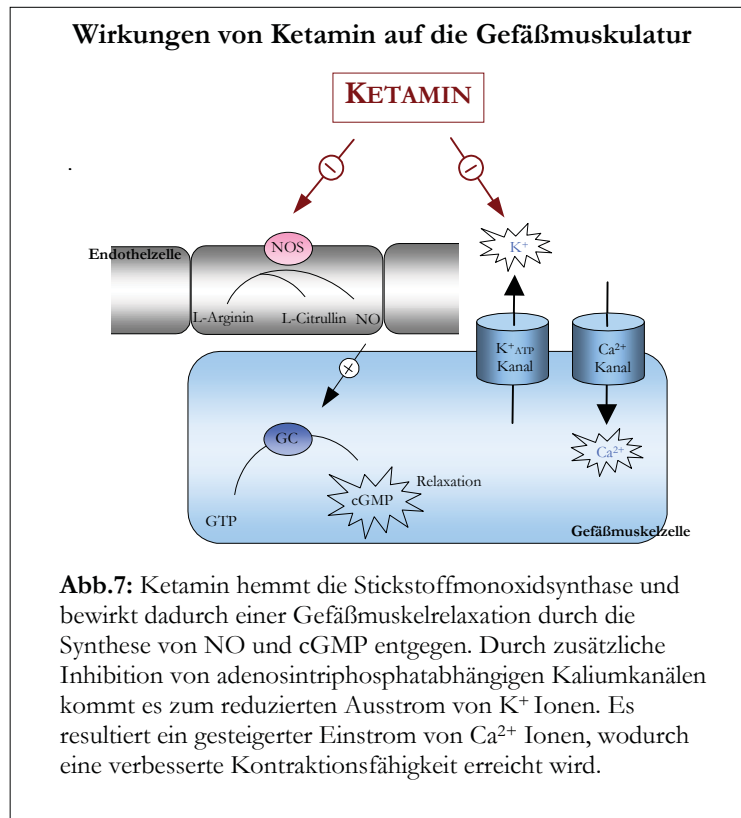
Glycerol und Eiphasphatiden. Propofol ist ein kurzwirksames intravenöses Hypnotikum ohne analgetische Potenz, das inzwischen in diversen galenischen Formulierungen im Handel ist, die sich vor allem in der Zusammensetzung der Fettemulsion unterscheiden. Differenzen in Pharmakodynamik und -kinetik sind jedoch in zahlreichen Studien nicht bestätigt wurden (Doenicke et al., 1997; Knibbe et al., 2000; Ward et al., 2002; Theilen et al., 2002).

Propofol entfaltet seine Pharmakodynamische Wirkung durch Verstärkung von GABA an inhibitorischen Neurotransmittern (Thurmon et al., 1996; Branson et al., 2001). Werden klinisch relevante Konzentrationen appliziert, aktiviert Propofol den GABA-Rezeptor-Chlorid-Ionophoren-Komplex (Short et al., 1999; Reves et al., 2000). Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch bislang noch unklar.

Hämodynamisch zeigte eine Studie von LIPPMANN ET AL. innerhalb weniger Minuten eine kardiale Depression mit Abnahme des mittleren arteriellen Blutdrucks, des Herzindexes und der linksventrikulären Funktion (Lippmann et al., 2006). Wenngleich die Ursachen für diese Blutdruckabnahme nicht vollständig geklärt sind, spielen direkte periphere Vasodilatation sowie die Abnahme der Vorlast des Herzens und der Kontraktionskraft eine bedeutende Rolle. Auch inhibitorische Wirkungen auf den Sympathikus sind beschrieben worden. Dementsprechend ist eine vorsichtige Handhabung vor allem bei kritisch Kranken mit kardialer Dysfunktion unerlässlich (Reich et al., 2005; Lippmann et al., 2006).

### 1.4.2 Ketamin, Ketamin „r“ und „s“

Ketamin ist ein *Phenylcyclidinderivat*, das chemische Analogien mit Halluzinogenen, wie LSD, aufweist. Pharmakodynamisch fungiert Ketamin dabei als nicht kompetitiver N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA) Antagonist (Ilkjaer et al., 1996; Sou et al., 2006), der intravenös oder intramuskulär appliziert werden kann. Daraus resultiert ein inhibitorischer Effekt auf den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat. Zusätzlich zeigt Ketamin schwache agonistische Effekte an Opioid-



und GABA-Rezeptoren. Weiterhin wirkt es hemmend auf die neuronale und extraneuronale Wiederaufnahme von Katecholaminen (Lundy et al., 1986), wie Noradrenalin und Dopamin, mit Verstärkung endogener und exogener Katecholamineffekte (Doenicke et al., 1992; Kress et al., 1994; Jansen et al., 2001).

Im Rahmen von systemischen Entzündungsreaktionen resultiert eine vermehrte Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen in Gefäßmuskelzellen. Folglich kommt es zum Anstieg von Kalium- ( $K^+$ -) Ionen nach extrazellulär, was eine Hyperpolarisation der

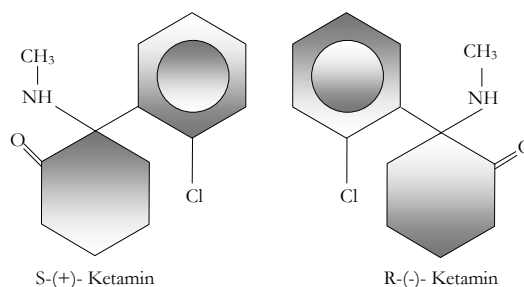
Zellmembran bewirkt. Eine dadurch bedingte Verminderung der Öffnungswahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$ -Kanälen führt zu einer Beeinträchtigung der Kontraktionsfähigkeit von Gefäßmuskelzellen (Nelson et al., 1995; Lange et al., 2006). Durch die antagonistische Wirkkomponente auf diese Kanäle resultiert unter Applikation von Ketamin ein vasokonstriktorisches Effekt auf die glatte Gefäßmuskulatur. In einer kürzlich von CHEN ET AL. publizierten Studie konnte die These bekräftigt werden, dass die ketaminassoziierte Steigerung (therapeutische Konzentration) des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAD) zumindest partiell auf die Hemmung der NOS-Aktivität zurückzuführen ist (Chen et al., 2005). Besonderes Augenmerk gilt den vasokonstriktorisches Wirkmechanismen an der glatten Gefäßmuskulatur, da Ketamin im Gegensatz zu den meisten anderen Anästhetika kreislaufstimulierende Effekte präsentiert und somit in der Therapie kritisch Kranker mit refraktärer Hypotension große Bedeutung erlangen könnte. Zusammenfassend werden diese pharmakodynamischen Wirkungen an der Gefäßmuskulatur in Abbildung 7 dargestellt.

Das pharmakologische Profil ist insbesondere durch die dissoziative Anästhesie mit ausgeprägter Analgesie bei erhaltenen Schutzreflexen schon in subdissoziativen Dosen gekennzeichnet. Außerdem zeigt sich eine geringe hypnotische Potenz und eine sympathomimetische Wirkung mit Steigerung von mittlerem arteriellen Blutdruck (MAD), Herzfrequenz (HF) (Adams et al., 1997; Zielmann et al., 1997) und myokardialen Sauerstoffverbrauch. Trotz kardialer Belastung bleibt das



Herzzeitvolumen unverändert (Lange et al., 2006). Aufgrund dieser Eigenschaften gilt Ketamin als Mittel der Wahl bei hämodynamisch instabilen Patienten (Sehdev et al., 2006)

Die herkömmliche Ketamin-Darreichungsform stellt ein Racemat dar. Dieses besteht zu gleichen Teilen aus einem links- und einem rechtsdrehendem Isomer (Abb. 8). Trotz der fast vollständigen Identität der beiden Moleküle sind relevante biologische Wirkunterschiede zu verzeichnen. Beispielsweise in der Rezeptoraffinität, im Arzneimittelmetabolismus und damit sowohl in pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften (Mutschler et al., 1996; Adams et al., 1997). WAY ET AL. beobachteten erstmals 1978, dass S-(+)-Ketamin eine doppelt so starke analgetische und anästhesiologische Potenz wie das Racemat aufzeigt. Eine Verdreifachung dieser



**Abb 8:** chemische Strukturformeln von S-(+)-Ketamin und R-(-)-Ketamin

Wirkung wurde gegenüber dem R-(-)-Ketamin beschrieben (Way et al., 1978; White et al., 1985; Klepstad et al., 1990; Schüttler et al., 1992, Kress et al., 1997). Auch an den  $\kappa$ - und  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren wirkt S-(+)-Ketamin etwa vierfach stärker inhibitorisch als das R-Isomer. Das R-(-)-Enantiomer aktiviert dafür intensiviert  $\delta$ -Rezeptoren, wohingegen die Affinität des S-(+)-Eutomers wesentlich geringer ist. Die Aktivierung dieser  $\delta$ -Rezeptoren ist mit dem Auftreten unangenehmer Träume, mit Halluzinationen und fehlendem Erinnerungsvermögen während der Aufwachphase assoziiert (Hirota et al., 1999). Zudem belegte der größere Bedarf an zusätzlichen R-(-)-Ketamin, dass mit diesem Isomer keine gleichwertige Narkosetiefe erreichbar ist (White et al., 1985).

Das Racemat hat bei der Anwendung als Monosubstanz eine hohe Inzidenz für unangenehme Aufwachreaktionen (White et al., 1980; Moretti et al., 1984; Bowdle et al., 1998). Seit fast einem Jahrzehnt steht zusätzlich das isolierte rechtsdrehende Isomer S-(+)-Ketamin (Jansen et al., 2001) zur Verfügung, welches in der klinischen Anwendung häufig das Racemat ersetzt (Adams et al., 1997). Im Gegensatz zu diesem werden eine Reduktion psychomimetischer Aufwachreaktionen und eine verminderte Stimulierung des Herz-Kreislauf-Systems diskutiert (Doenicke et al., 1992; Adams et al., 1992/97).

## 1.5 Apoptose

1972 wurde der Begriff „Apoptose“ von Kerr und Currie et al. als eine Art des Zelltodes mit charakteristischen morphologischen Veränderungen eingeführt, der sich grundlegend vom pathologischen nekrotischen Zelluntergang unterscheidet (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980) und auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird.



Apoptose stellt einen physiologischen Prozess mit verschiedenartigen Facetten dar. Zum einen ist der programmierte Zelltod im Rahmen der Entwicklung ebenso wichtig wie die Zellteilung und die Zellmigration, zum anderen ist es essentiell, dass dysfunktionelle, überschüssige oder geschädigte Zellen eliminiert werden, die die Homöostase bedrohen könnten. Vielseitige Signale sind in der Lage, Apoptose zu induzieren oder zu inhibieren. Überlebenssignale aus dem benachbarten Zellmilieu und interne Sensoren für die Integrität im Zellverband kontrollieren den Mechanismus der Apoptose (Evan et al., 1998). Nahezu alle Signale resultieren entweder mit Hilfe von Rezeptoren über eine transmembranöse Signalübermittlung oder direkt innerhalb des Zytoplasmas in der Aktivierung einer Kaspasenkaskade. Apoptose stellt auch einen entscheidenden Pathomechanismus in der Sepsis dar. Ein progredienter Verlust vitaler Zellen kann beispielsweise während einer Hypoxie über mitochondriale Dysfunktion und Induktion einer Zytokinantwort den molekularen Mechanismus der Organdestruktion verstärken (Cobb et al., 2000; Paxian et al., 2003). Es existieren eine Vielzahl verschiedenster Signalwege, die durch unterschiedlichste Kaskaden den programmierten Zelltod einleiten können. Allen Signalwegen ist nach zahlreichen Überschneidungen die resultierende Degradation der Zellfragmente gemeinsam.

### 1.5.1 Morphologische Veränderungen

Das Absterben der Zelle beruht auf einem selbstausgelösten genvermittelten Todesprogramm. Anfangs beobachtet man zunächst eine Verminderung des Zellvolumens. Der Zellstoffwechsel läuft jedoch noch über eine geraume Zeit unverändert weiter (Leist et al., 2001). Es folgt eine Schrumpfung des Zellkerns mit Verdichtung des Chromatins (Pyknose). Anschließend kommt es unter der Bildung von Ausstülpungen zu Zellmembrandeformierungen, die nach Abschnürung die sogenannten *apoptotic bodies* bilden. Die Zytoplasmamembran bleibt während der gesamten Vorgangs intakt (Leist et al., 2001). Im Zellkern wird die chromosomale DNA mit Hilfe spezifischer kalzium- und magnesiumabhängiger Endonukleasen (Wyllie et al., 1980; Schulze-Osthoff et al., 1994b) in nahezu gleich große Abschnitte von 180 Basenpaare gespalten (Los et al., 2000). Die Präsenz dieser DNA-Abschnitte dient als Marker für den apoptotischen Prozess. Die Mehrzahl der entstandenen Zellfragmente wird intrazellulär abgebaut. Durch Intaktheit der Membran werden entstehende Zytokine, Sauerstoffradikale und Enzyme kompartimentalisiert, weshalb keine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Zudem werden auf apoptotischen Zellen Signalmoleküle exprimiert, wie zum Beispiel Phosphatidylserin, die den Makrophagen zur Phagozytose präsentiert werden (Anderson et al., 2003).

### **1.5.2 Phosphatidylserin**

Auf molekularer Ebene kommt es in den frühen Stadien der Apoptose zur Änderung der Phospholipidverteilung innerhalb der Zellmembran. Phosphatidylserin (PS) wird normalerweise asymmetrisch auf der zytoplasmatischen Seite der Membran exprimiert. Eine kurzzeitige Dyslokation von PS auf die Membranaußenseite wird normalerweise sofort durch die Tätigkeit einer Aminophospholipid-Translokase (APLT) korrigiert (Zachowski et al., 1986; Bevers et al., 1999; Daleke et al., 2000). Während der Apoptose transloziert PS jedoch nach Aktivierung des Enzyms Scramblase vermehrt auf die Zellmembranaußenseite. Dieses Enzym hält die Dyslokation von PS auf die zytosolische Seite aufrecht (Fadok et al., 1992; Martin et al., 1995; Verhofen et al., 1995; Fadok et al., 1998; Frasch et al., 2000). Dieser Markierungsmechanismus bildet die Grundlage für eine selektive Eliminierung apoptotischer Zellen durch phagozytierende Zellen (Fadok et al., 1998; Leist et al., 2001), da PS-positive Zellen von PS-Rezeptoren auf Makrophagen identifiziert werden. In unserer Arbeit dient Phosphatidylserin dazu, in einem Teilexperiment frühzeitige Zelluntergänge mittels Durchflusszytometrie aufzudecken.

## 2. Fragestellung

Die zwei anerkannten Anästhetika Propofol und Ketamin beeinflussen die TNF $\alpha$ -Expression aller zirkulierenden Leukozytenpopulationen. Im Vollblutansatz gesunder Probanden wurde mit Hilfe eines durchflusszytometrischen Assays der Gehalt an intrazellulärem TNF $\alpha$  in Leukozyten nach Stimulation mit Endotoxin und fMLP als Maß für die inflammatorische Aktivierbarkeit unter dem Einfluss dieser Anästhetika quantifiziert.

Propofol steigerte die TNF $\alpha$  Expression deutlich über den Level der bereits erhöhten TNF $\alpha$ -Antwort stimulierter Zellen. Im Gegensatz dazu suppressierte Ketamin diese TNF $\alpha$ -Antwort in diesen Monozyten. Diese bereits veröffentlichten Aspekte wurden durch Differenzierung der suppressiven Wirkung zwischen dem (R)- und (S)-Diastereomeren gegenüber dem Racemat von Ketamin ergänzt. Außerdem wurden die Betrachtungen in Ergänzung zur Arbeitsgruppe von HOFF ET AL. auf alle Leukozytenpopulationen ausgedehnt.

Ziel unseres Projektes ist es einerseits zelltypische Effekte von Ketamin und Propofol auf eine bakteriell stimulierte TNF $\alpha$ -Antwort zu untersuchen, andererseits soll der Einsatz von Propofol, Ketamin bzw. seiner Diastereomere bei der Narkose besser beurteilt werden. Des Weiteren sollen Langzeiteffekte auf Immunsystem insbesondere bei analgosedierten Patienten und eine Immunsuppression als etwaige Nebenwirkung der Anästhetika besser eingeschätzt werden.

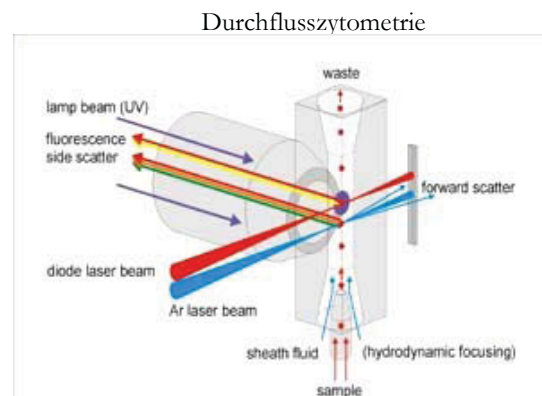
### 3. Material und Methodik

#### 3.1 Intrazelluläre Zytokinmessung mittels Fluoreszenzzytometrie

##### 3.1.1 Grundlagen FACS

Die Durchflusszytometrie (fluorescens-activated-cell-sorting) ist eine Technik zur fluoreszenzabhängigen multiparametrischen Analyse von Zellen in Suspension. Sie basiert auf der Analyse von Streulicht und Fluoreszenzsignalen, die durch Laserlichtquellen angeregt werden. Zellgröße und Granularität ebenso wie Dichte und Verteilung multipler Marker auf der Oberfläche oder im Zytoplasma der Zelle können mit Hilfe spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper bestimmt werden (Fehrenbach et al., 2005). Das Anwendungsspektrum reicht von der Immunphänotypisierung mittels Oberflächenmarker über die Analyse von intrazellulären Antigenen, bis hin zur Bestimmung von Nukleinsäuregehalt, Phagozytose und Apoptose.

Ein Durchflusszytometer besteht aus drei miteinander verknüpften Komponenten: dem Flüssigkeitsstrom, der Optik und der Signalverarbeitung. Nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung werden die Zellen durch eine laminare Strömung der Trägerflüssigkeit (Hüllstrom) in die Messküvette geleitet, durch deren konische Form beschleunigt (bis zu 7m/s) und perlschnurartig aufgereiht durch den Laserfokus geführt. Am Analysenpunkt trifft monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488nm, das mittels eines luftgekühlten Argonlaserstrahls generiert wird, auf die Einzelzelle (Abb.9).



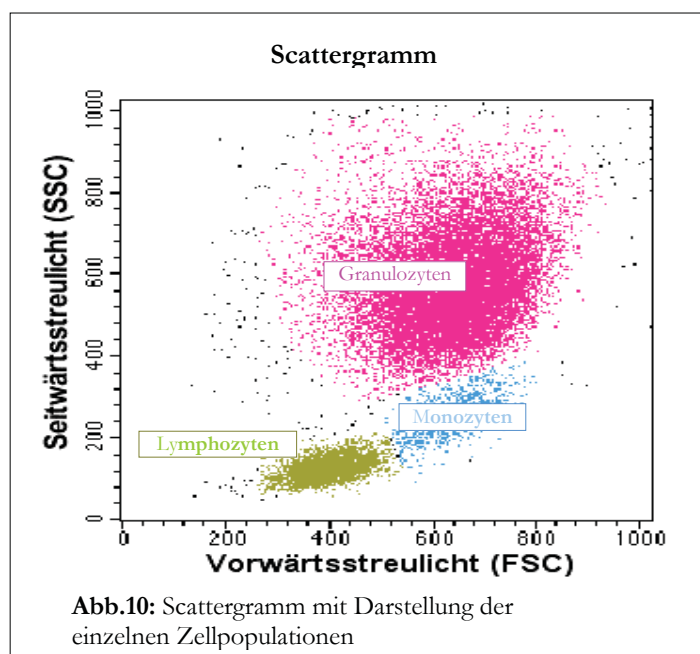
**Abb 9:** Prinzip der Durchflusszytometrie  
Quelle: Partec Durchflusszytometrie

Abhängig von verschiedenen physikalischen Eigenschaften, wie Querschnittsfläche, Membranstruktur und intrazellulären Bestandteilen, wird das Licht, das auf die Zelle trifft unterschiedlich stark gestreut. Am größten ist die Streuung im Kleinwinkelbereich von 0-10°. Dieses Vorwärtssstreulicht (forward light scatter, FSC), korreliert mit dem Querschnitt der Zelle und lässt Rückschlüsse auf deren Größe zu. Den kleineren Teil, der im 90°-Winkel abgestrahlt wird, bezeichnet man als Seitwärtsstreulicht (sideward light scatter, SSC). Dieser gibt Informationen über Granularität, Membranfaltung und äußere Form der Zelle.

Die zu bestimmenden Zellen können mit monoklonalen Antikörpern markiert werden, die ihrerseits mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Um die Fluorochrome anregen zu können, macht man sich die Emissionslinie bei 488nm zunutze. Die absorbierte Lichtenergie hebt die Elektronen auf ein

höheres Energieniveau. Beim Rücksprung kommt es zur Abgabe eines Photons, der Fluoreszenz. Es können simultan drei Fluorochrome verwendet werden. Anhand dieser Messung spezifischer Fluoreszenzen kann die Anzahl positiver Ereignisse im Vergleich zur Negativkontrolle bestimmt werden. Farbstoffe zur Markierung von Antikörpern und Partikeln werden kovalent gebunden: Fluoreszein (FITC, DFTF), R-Phycoerythrin (PE ein Makromolekül aus Algen), Peridiniumchlorophyll-Protein (PerCP, Überträgerprotein aus der pflanzlichen Photosynthese) und Tandemkonjugate wie PE-Cy5 oder PE-Texas-Rot.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörpern handelte es sich um die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Tandemkonjugate (PE-Cy5). Das Fluoreszenzspektrum von FITC weist ein Maximum bei circa 515nm (gelb-grün), das von PE-Cy5 ein Maximum bei 650 nm (dunkelrot) auf. Damit sind die Gipfel der Emissionsmaxima deutlich voneinander zu unterscheiden und können von entsprechenden Detektoren erfasst werden. Die Proben in unseren Untersuchungen wurden jeweils mit 5 µl der monoklonalen Antikörper gegen den Oberflächenrezeptor CD14 der Monozyten (gekoppelt mit R-PE, BIOZOL, Eching, Deutschland; LOT: BZL02021) und dem intrazellulär exprimierten TNF $\alpha$  (gekoppelt mit



Fluoreszenzfarbstoff FITC, BD, San Diego, USA; LOT: 554512) markiert.

Somit lassen sich Monozyten von anderen Zellpopulationen (Granulozyten, Lymphozyten) unterscheiden und eine getrennte Betrachtung durch Gating ist möglich.

Über Spiegel- und Filtersysteme werden die von jeder einzelnen Zelle ausgesandten Fluoreszenz- und Streulichtsignale auf Photoverstärkerröhren geleitet. Diese Signale werden von Detektoren erfasst.

Es wird die Amplitude des Pulses bestimmt und zur quantitativen Auswertung auf den angeschlossenen Computer übertragen. Die Messdaten werden in einem Scattergramm dargestellt (Abb.10).

### 3.1.2 Probanden

Untersucht wurden im Rahmen dieser Dissertation 6 freiwillige gesunde Probanden. Auf spezielle anamnestische Charakteristika wurde nicht eingegangen.

### 3.1.3 Versuchaufbau

Als Kompromiss zwischen *in vivo* und *in vitro* Studien nutzen wir einen Vollblutansatz. *In vitro* Studien können vorteilhaft den direkten Effekt der Anästhetika auf die immunkompetenten Zellen darstellen. Nachteilig hingegen ist die Reduktion des physiologischen Milieus auf ein Mindestmaß. Ferner können Interaktion zwischen den einzelnen Komponenten des Immunsystems und dem Endothel nicht beurteilt werden. Im Vergleich dazu befinden sich die Zellen *in vivo* in ihrem physiologischen Umfeld, die Aspekte der beobachteten Veränderungen können jedoch nicht den direkten Wirkungen der Anästhetika zugeschrieben werden, sondern könnten auch durch zahlreiche exogene und endogene Faktoren (z.B. Stress, Venenpunktion) initiiert werden.

Von 6 gesunden freiwilligen Probanden wurden 30ml venöses Blut mit Lithium-Heparin-Monovetten (SARSTEDT Monovette, Nuembrecht, Germany) entnommen und anschließend steril weiterverarbeitet in Anlehnung an das Protokoll der Firma Becton Dickinson (BD-Protokoll) für intrazelluläre Zytokinfärbung (BD, FASTIMMUNE™ Control  $\gamma_{2a}$  FITC/ $\gamma_1$  PE). Das Blut wurde auf 30 Zentrifugenröhrchen zu je 500 $\mu$ l verteilt. Wir untersuchten die Narkotika Propofol (FRESENIUS KABI Propofol 1%, 10mg/1ml; Ch.-B.: 1018109DZ) und Ketamin (RATHIOPHARM, Bad Homburg, Deutschland, 1Amp 2ml, 115,4ml Ketaminhydrochlorid entspricht 100mg Ketamin; Ch.B.: 18070), wobei vom Racemat Ketamin beide Enantiomere zusätzlich einzeln beurteilt wurden. Die Medikamente wurden jeweils in klinischer und pharmakologischer (zehnfacher) Dosierung untersucht; dabei schloss jeder Ansatz eine Negativ-Kontrolle und zwei bakteriell stimulierte Proben ein. Die klinische Konzentration ist dabei mit Werten vergleichbar, die bei einer Einzelbolus-Injektion auftreten (Larsen et al., 1998). Zunächst erfolgte eine einstündige Vorinkubation der Medikamente im Vollblut. Drei Röhrchen wurden als Kontrolle nicht vorbehandelt.

Anschließend wurden 20 Proben mit jeweils 5 $\mu$ l LPS (Toxin and Technology, Sarasota, USA) (zur Induktion der monozytären TNF Expression) oder 1 $\mu$ l  $10^{-6}$  fMLP (Toxin and Technology, Sarasota, USA) (vorwiegend zur granulozytären Aktivierung) stimuliert. Zur intrazellulären TNF $\alpha$ -Messung in Lymphozyten wurde ein Aliquot mit 1 $\mu$ g/ml der kostimulatorischen Antikörper CD28 und CD49d (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) und mit 2,5 $\mu$ g/ml des Staphylokokken Superantigens B (SEB) (Toxin and Technology, Sarasota, USA) aktiviert und für weitere 2h mit lose aufgeschraubten Deckeln im Brutschrank bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 0,9 $\mu$ l Brefeldin A (ALEXIS, San Diego, USA; LOT: 350019M005) wurde der Proteintransfer aus der Zelle unterbunden. Brefeldin A ist ein Golgi Apparat-Blocker, der die Ausschleussung von Vesikeln, durch Hemmung der Zytoskelettproteine, verhindert. Die Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> umfasste weitere 4h. Nach Zugabe von 200 $\mu$ l Cellwash (BD, San Diego, USA) wurde mit

der ersten Antikörperfärbung zunächst für Monozyten und Granulozyten begonnen. Dabei wurden jeweils 5µl Anti-CD14-RPE (BIOZOL, Eching, Deutschland; LOT: BZL02021) zupipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anti-CD-14 soll vornehmlich zur Differenzierung zwischen Monozyten und Granulozyten dienen. Folgend wurden die Erythrozyten mittels 2ml FACS™-Lysingsolution (BD, San Diego, USA; LOT: 349202) 3 Minuten lysiert. Danach wurden die Proben 8 Minuten bei 350g zentrifugiert, anschließend dekantiert. Das Pellet wurde mit 2ml Cellwash resuspendiert und erneut für 8min bei 350g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes pipettierten wir 500µl FACS Permeabilizing- Solution (BD, San Diego, USA; LOT: 340457) hinzu. Diese ermöglicht innerhalb von 10 Minuten die Bildung von Poren in der Zellmembran, die von Antikörpern durchdrungen werden konnten. Nach erneutem Zentrifugieren und Dekantieren folgte ein Waschschrift mit Cellwash und anschließender intrazellulärer Färbung mit Anti-TNFα-FITC (BD, San Diego, USA; LOT: 554512). Dieser Antikörper wurde für 35 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze zur Analyse der Lymphozyten wurden parallel mit folgenden monoklonalen Antikörpern für 45 Minuten im Dunkeln inkubiert: Anti-CD4 PC5 (Coulter Immunotech, Krefeld, Germany) oder Anti-CD8 PC5 (Coulter Immunotech, Krefeld, Germany), Anti-CD69-PE (Coulter Immunotech, Krefeld, Germany) und zur Darstellung der Expression des Zytokins Anti-TNFα FITC (BD, San Diego, USA; LOT: 554512). Durch Zufügen von 2ml Cellwash und nachfolgender Zentrifugation bei 350g wurden überschüssige Antikörper entfernt. Das Pellet wurde mit 500µl resuspendiert und stand nach dem Umpipettieren in FACS-Röhrchen der Messung am FACS Scan (Becton Dickinson) zur Verfügung. Die Abbildung 11 zeigt eine Zusammenfassung des BD-Protokolls am Beispiel für die intrazelluläre Färbung in Monozyten und Granulozyten.

# **Einfluss von Propofol und Ketamin auf die Zytokinexpression** FACS- Analyse

## **0. Blutentnahme**

3 x 10ml Heparinplasma/Proband

## **1. Stimulation**

3x Kontr olle negati v	3x 7,5µl Lipo fund in	3x 1µl Ketam in	3x 10µl Ketam in	3x 1µl Ketam in-s	3x 10µl Ketami n-s	3x 1µl Ketami n-r	3x 10µl Ketami n-r	3x 1,5µl Propof ol	3x 15µl Propof ol
		einfach	10x	einfach	10x	einfach	10x	einfach	10x

vortexen  
1h Vorinkubation  
je ein Aliquot

-
1µl FLMP
5µl LPS (0111 E.coli)

vortexen  
2h Inkubation  
im Brutschrank mit lose aufgeschraubten Deckeln, 37°C, 6% CO<sub>2</sub>

je 0,9µl Brefeldin A-Stammlösung
----------------------------------

vortexen  
4h Inkubation  
im Brutschrank mit lose aufgeschraubten Deckeln, 37°C, 6% CO<sub>2</sub>

## **2. Fixieren der Zellen**

200 µl Cellwash
5 µl Anti-CD14-PE-Cy5

vortexen  
30 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln

2 ml 1x FACS™-Lysingsolution
------------------------------

vortexen  
7 min inkubieren bei RT im Dunkeln, bis Klarwerden der Lösung

2x 2ml Cellwash
-----------------

über Kopf schwenken  
zentrifugieren 8min 350g  
dekantieren

500µl 1x FACS-Permeabilizing-Solution
---------------------------------------

vortexen  
12 min inkubieren bei RT im Dunkeln  
zentrifugieren 8min 350g  
dekantieren

2 ml Cell-Wash
----------------

vortexen  
zentrifugieren 8min 350g  
dekantieren

5 µl Anti-TNF-α- FITC
-----------------------

vortexen  
35 min inkubieren bei RT im Dunkeln

2 ml Cell-Wash
----------------

zentrifugieren 8min 350g  
dekantieren

500 µl Cell-Wash
------------------

**Messung**

**Abb: 11** Versuchsprotokoll intrazelluläre TNFα-Expression



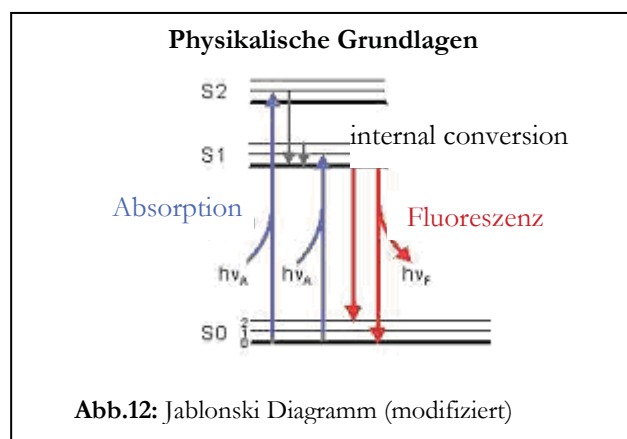
### 3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung dient der qualitativen Ergänzung zur intrazellulären TNF $\alpha$ -Expression am FACS.

#### 3.2.1 Grundlagen Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenz ist eine Art der möglichen Lichterscheinungen, die unter dem Oberbegriff Lumineszenz zusammengefasst werden. Lumineszenz beschreibt die Emission von Licht im sichtbaren und UV-Bereich, basierend auf dem Elektronenübergang von einem energetisch höheren Niveau auf einen energetisch niedrigeren Zustand.

Das Phänomen der Fluoreszenz entsteht durch den Übergang eines Moleküls von dem angeregten Singulettzustand  $S_1$  ( $v'=0$ ) unter Emission eines Photons in den  $S_0$ -Zustand. Die Wellenlänge des abgestrahlten Lichts ist aufgrund der geringeren Energie des emittierten Photons länger als die der



Anregung. Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Tatsache, dass bestimmte Atome oder Moleküle einen Teil des von ihnen absorbierten Lichts in Form einer langwelligeren (energieärmeren) Strahlung wieder abgeben. Dieses Fluoreszenzlicht erlischt kurze Zeit nach der Bestrahlung. Die Elektronen der angeregten Moleküle des Fluoreszenzfarbstoffes springen dabei

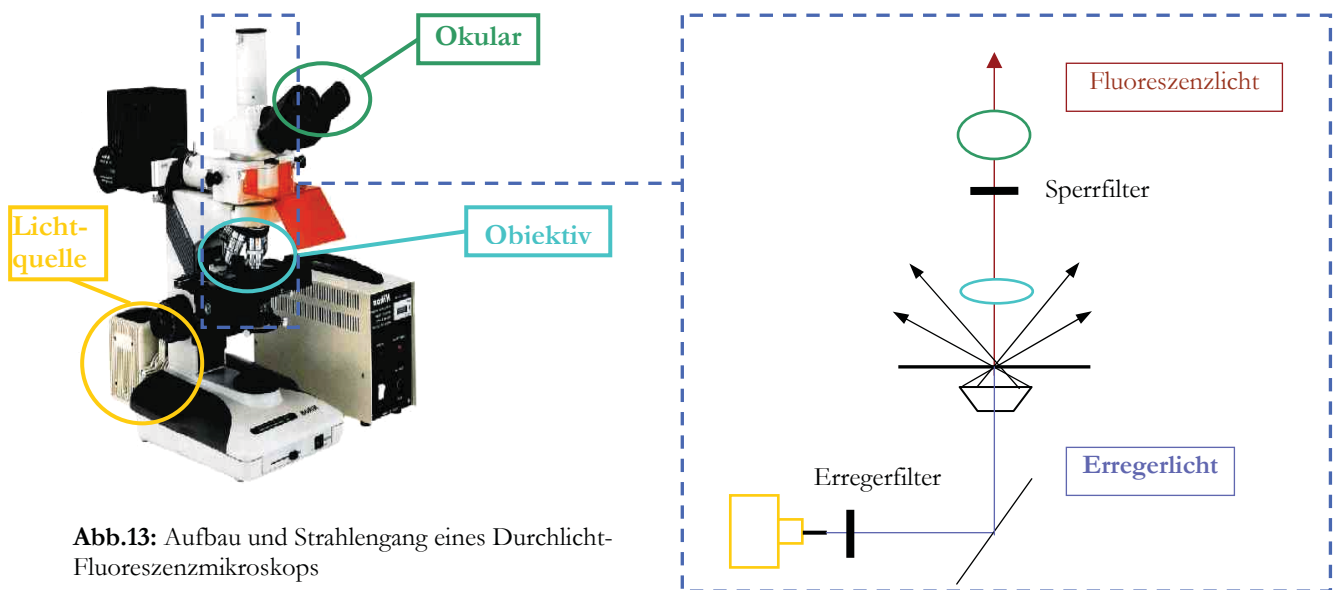
innerhalb von Nanosekunden unter Abgabe des charakteristischen Fluoreszenzlichtes wieder in ihren Ausgangszustand zurück. Diese Prozesse, die von der Absorption von Anregungslicht zur Emission von Fluoreszenzlicht führen, werden in Jablonski- Diagrammen (Abb.12) dargestellt, benannt nach dem Physiker ALEXANDER JABLONOSKI, dem Begründer der modernen Fluoreszenzmikroskopie. (Rost et al., 1992; Hermann et al., 1998)

Substanzen, die Fluoreszenzlicht ausstrahlen können, werden Fluorochrome oder Fluorophore genannt. Fluorochrome sind alle Farbstoffe, die ein nicht fluoreszierendes Objekt fluoreszieren lassen. Fluorophore sind lediglich Atomgruppierungen organischer Verbindungen, die Fluoreszenz ermöglichen. Die Fluoreszenz wird in zwei Erscheinungen unterteilt, der Primär- und der Sekundärfluoreszenz. Primärfluoreszenz ist die Fähigkeit einiger Substanzen (z.B. Chlorophyll), von sich aus bei Anregung mit kurzwelliger Strahlung Fluoreszenz zu emittieren. Dieses Phänomen bezeichnet man als Autofluoreszenz. Da die verwendeten Stoffe in dieser Arbeit keine Primärfluoreszenz aufweisen, werden Fluorochrome zum Färben verwendet. Dieser Färbeprozess

wird als Fluorochromierung bezeichnet und die auftretende Fluoreszenz wird Sekundärfluoreszenz genannt (Pluta et al., 1993).

Es gibt zwei Arten der Fluoreszenzmikroskopie, die Durchlicht- und die Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie, die sich durch die Anordnung der Lichtquelle unterscheiden (Ploem et al., 1987). In dieser Arbeit wurde die Methode der Durchlicht-Fluoreszenzmikroskopie angewandt.

### Durchlicht-Fluoreszenzmikroskop



**Abb.13:** Aufbau und Strahlengang eines Durchlicht-Fluoreszenzmikroskops

Das Fluoreszenzmikroskop besteht aus 3 Komponenten: (Abb.13: Prinzip eines Durchlicht-Fluoreszenzmikroskopes)

- 1.) Eine starke **Lichtquelle**, die vornehmlich kurzwellige Strahlung emittiert (Quecksilber-, Xenon- Hochdrucklampen). Die Wahl der Lichtquelle ist abhängig von dem Absorptionsspektrum des Fluorochroms, da die Strahlungsintensität ausreichen muss, um die Fluoreszenz anzuregen. Aufgrund der großen Strahlungsintensität im ultravioletten, violetten und blauen Spektralbereich werden Quecksilberlampen als Universallampen eingesetzt, während Xenonlampen nur bei Blau- oder Grünanregung verwendet werden (Becker et al., 1983, Ploem et al., 1986; Rost et al., 1992)
- 2.) **Erregerfilter:** Dieser Filter sorgt dafür, dass nur Licht in einem bestimmten, sehr schmalen Wellenlängenbereich das Präparat erreicht (Rost et al., 1992).

z.B.: U-Filter, die im UV-Bereich Fluorochrome wie DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) anregen oder B-Filter, für die Anregung im blauen Bereich für Fluorochrome wie FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)

- 3.) **Sperrfilter:** Dieser Filter wird in den Strahlengang zwischen Objektiv und Okular eingeschoben. Er soll nur für langwellige, durch Emission im Präparat erzeugte Fluoreszenz durchlässig sein. (Rost et al., 1992)

Die klassische Bildverarbeitung setzt sich aus vier verschiedenen Operationen zusammen. Der Bildgewinnung, der Digitalisierung, der Bildverarbeitung und der Bildanalyse.

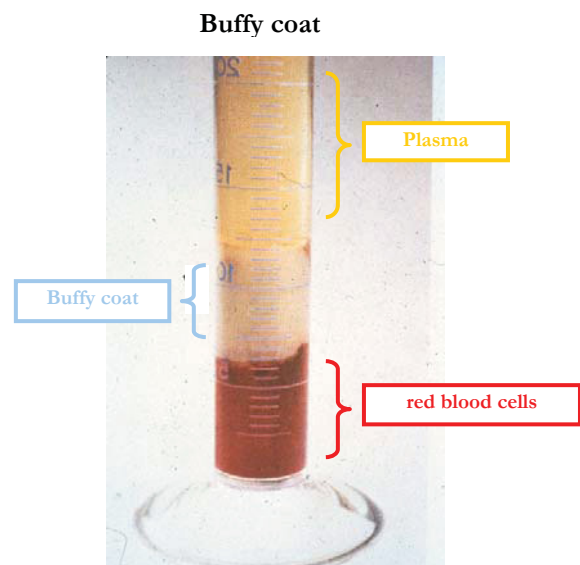
### 3.2.2 Probanden

Untersucht wurden im Rahmen dieser Beobachtung zwei freiwillige gesunde Probanden, welche bereits bei der intrazellulären Zytokinmessung mittels FACS zur Verfügung standen.

### 3.2.3 Versuchsaufbau

Zwei Probanden wurde mit Citrat-Monovetten (SARSTEDT Monovette, Nuembrecht, Germany) 20ml Blut entnommen, welches unmittelbar danach 10 Minuten bei 240g und anschließend 2 Minuten bei 500g zentrifugiert wurde. Der dabei entstandene *Buffy coat* (Abb.14) wurde abpipettiert und in 3,2 ml HBSS- Puffer (GIBCO; LOT:

14175-053) resuspendiert. Diese Suspension wurde zu je 3x2x500µl aliquotiert. Wir untersuchten die Narkotika Propofol und Ketamin, wobei wir jeweils eine Negativkontrolle und einen bakteriell stimulierten Ansatz mitführten. In je 2 Röhrchen wurden 15µl Propofol oder 10µl Ketamin zugefügt. Zwei Röhrchen blieben unbehandelt. Nach einer einstündigen Vorinkubation im Brutschrank bei 37°C und 6% CO<sub>2</sub> wurde je ein Ansatz mit 5µl LPS



**Abb.14:** Darstellung des Buffy coats

stimuliert. Eine erneute Inkubation von 3h im Brutschrank mit lose aufgeschraubten Deckeln folgte. Anschließend wurde 0,9µl Brefeldin A (ALEXIS, San Diego, USA; LOT: 350019M005) zugegeben. Nach weiteren 3h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 6 % CO<sub>2</sub>, wurden die Erythrozyten mit je 2,5ml FACS-Lysing Solution (BD, San Diego, USA; LOT: 349202) 2-3 Minuten lysiert. Diese Reaktion wurde mit 2,5ml Cellwash (BD, San Diego, USA) gestoppt und folgend bei 350g 8 Minuten zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 2ml Cellwash wurde das Pellet mit 200µl

Cellwash und 1% Formaldehyd resuspendiert. Formaldehyd dient hierbei zur Fixierung der Zellen. Jeweils 10 µl dieser Suspension wurden auf saubere Deckgläschen aufgetragen. Während der Trocknung wurden „feuchte Kammern“ vorbereitet. Hierfür wurden 5 µl HBSS- Puffer mit 0,1% Triton X (SIGMA; LOT: 129H0029) und 1% BSA (>98 % pulv. bovinen serum albumin, Fraktion V Artikelnummer: 8076, ROTH) versetzt und auf den Parafilm aufgetragen. Diese Suspension diente zur Permeabilisierung der Zellmembran. Die getrockneten Deckgläschen konnten anschließend für 45 Minuten in dieser Lösung inkubieren. Währenddessen wurde eine neue „feuchte Kammer“ mit jeweils 50µl Antikörper-DAPI-Lösung vorbereitet. Dabei wurden insgesamt 750µl DAPI, 10µl Anti-TNFα-FITC (BD, San Diego, USA; LOT: 554512) und 18µl Anti-CD14-RPE/Cy5 (BIOZOL, Eching, Deutschland; LOT: BZL02021) miteinander vermischt. Über Nacht folgte die Inkubation mit der Antikörper-Mischung im Kühlschrank. Vor dem Eindecken wurden am nächsten Morgen die Deckgläschen mit HBSS-Puffer gewaschen. Abschließend wurde mit Vectashild (VECTOR Laboratories, Burlingame, USA; CAT. No. H-1400) eingedeckt. Die Messung am Mikroskop schloss sich unmittelbar an. In 40-facher Vergrößerungen wurde zunächst die DAPI-Färbung bei einer Belichtungsdauer von 1ms fluoreszenzmikroskopisch betrachtet. Anhand der Kernfärbung wurden verschiedene Zellpopulationen identifiziert und nach einer weiteren Belichtungszeit von 6,5s die TNFα-Expression im Endoplasmatischen Retikulum demonstriert. CD14 positive Zellen konnten dann im selben Bildausschnitt nach einer Belichtung von ebenfalls 6,5 s dargestellt werden. Zusammenfassend wird dieses Protokoll in Abbildung 15 dargestellt. Aufgrund der verschiedenen Antikörper konnten fluoreszenzmikroskopisch differenzierte Aussagen getroffen werden. Die folgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick über die Interpretation der einzelnen Färbungen.

Dapi-Färbung (blau) 0,1 ms Belichtung	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dapi interkaliert in die DNA und stellt somit die Kernmorphologie dar, wodurch eine Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen ermöglicht wird</li> </ul>
Anti-CD14-RPE (rot) 6,5s Belichtung	<ul style="list-style-type: none"> <li>CD14 positive Zellen kommen zur Darstellung: Monozyten, Granulozyten sind CD14 subset-positiv (nur eine Untereinheit des Rezeptors wird exprimiert)</li> </ul>
Anti-TNF-FITC (grün) 6,5s Belichtung	<ul style="list-style-type: none"> <li>stellt TNFα im Endoplasmatischen Retikulum dar, da die Weiterleitung ins Golgisystem durch Brefeldin A gehemmt wurde</li> </ul>

**Tabelle 3:** Interpretation der Fluoreszenzfarbstoffe

## Versuchsprotokoll intrazelluläre Zytokinfärbung zur Fluoreszenzmikroskopie

### 1. Blutentnahme

2 x 10ml Citratplasma/Proband

### 2. Aufbereitung/ Stimulation/ Fixierung/ Färbung

10 min zentrifugieren 240g

2min zentrifugieren 500g

Buffy coat abpipettieren

in **3,2 ml HBSS- Puffer**  
resuspendieren, vortexen

aliquotieren

2x 500µl Suspension	2x 500µl Suspension	2x 500µl Suspension
	<b>15µl Propofol</b>	<b>10µl Ketamin</b>

1h Inkubation bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> im Brutschrank

In je einen der Ansätze  
Zugabe von **5µl LPS**  
(1 Röhrchen pro Ansatz dient der Kontrolle)

3h Inkubation bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> im Brutschrank

**0,9µl Brefeldin A**, vortexen

3h Inkubation bei 37°C, 6% CO<sub>2</sub> im Brutschrank

**2,5ml FACS-Lysing Solution**, vortexen

2-3min inkubieren bis zum klar werden der Suspension

**2,5ml Cellwash**, vortexen

8min zentrifugieren bei 350g  
dekantieren

**2ml Cellwash**, vortexen

8min zentrifugieren bei 350g  
dekantieren

in **200µl Cellwash + 1% Formaldehyd**  
resuspendieren, vortexen

**10µl der Suspension** auf Deckgläschen auftragen,  
trocknen lassen

feuchte Kammern vorbereiten

**50µl HBS-Puffer + 0,1% Triton X + 1% BSA**  
auf Parafilm tropfen

Deckgläschen mit Zellen nach unten auflegen  
45min inkubieren  
neue feuchte Kammer vorbereiten

**50µl AK-DAPI-Lösung** auf Parafilm geben

über Nacht im Kühlschrank inkubieren,  
vorm Eindecken das Deckgläschen mit HBSS-Puffer waschen,  
zum Eindecken **VECTASHILD** benutzen,  
die Deckgläschen mit Nagellack abdichten (Verdunstungsschutz)



Fluoreszenzmikroskopie

Abb. 15: Versuchsprotokoll Fluoreszenzmikroskopie

### **3.3 Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche als Apoptosemarker**

In diesem Experiment werden mittels Durchflusszytometrie frühzeitige Zelluntergänge dargestellt. Eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose wäre allerdings nur durch eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid möglich (Apoptose: Annexin-V positiv und PI negativ, nekrotische und spät-apoptotische Zellen: Annexin-V positiv und PI positiv).

Da in dieser Arbeit nur gezeigt werden soll, dass durch die Präparation der Blutkultur keine Zelluntergänge zu verzeichnen sind, wurde auf die Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose verzichtet.

#### **3.3.1 Probanden**

Untersucht wurden, im Rahmen dieses Experiments zwei freiwillige gesunde Probanden, welche bereits bei der intrazellulären Zytokinmessung mittels FACS zur Verfügung standen.

#### **3.3.2 Versuchsaufbau**

Zum Nachweis der Exposition von Phosphatidylserin auf der Membran apoptotischer Zellen wird mit fluoreszierenden Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppeltes Annexin V verwendet (Vermes et al., 1995). Das gerinnungshemmende Protein Annexin V bindet in Gegenwart von Calcium-Ionen mit hoher Affinität an Phospholipid-Doppelmembranen.

Unser Protokoll für intrazelluläre Zytokinmessung von BD wurde für diesen Versuch nur geringfügig modifiziert (siehe Protokoll unten). Die Ansätze mit jeweiligem Medikament und Stimulus wurden beibehalten. Die Hemmung der Zytoskelettproteine im Golgi Apparat mit Brefeldin A und die Lysierung der Erythrozyten mit BD-Lysing-Solution blieben unverändert. Die Fixierung der Zellen im Medium erfolgte in dieser Untersuchung jedoch mit Paraformaldehyd. Auf die Bildung von Poren in der Zellmembran konnte in diesem Experiment verzichtet werden, da die Phosphatidylrezeptoren bei apoptotischen Zellen zytosolisch exprimiert werden. Angefärbt wurde die Suspension zunächst mit jeweils 5µl Anti-CD14-RPE (BIOZOL, Eching, Deutschland; LOT: BZL02021) und für 20 min bei Zimmertemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde je 5µl Annexin V Antikörper (BD, San Diego, USA; CAT. NO: 556570) zupipettiert. Nach einer Inkubation von 5min pro Ansatz wurde die Messung am FACS unmittelbar angeschlossen.

Mittels dieser Studie ist es möglich, einen eventuellen Einfluss von Anästhetika auf das apoptotische Verhalten vitaler Zellen zu erkennen. Zudem zeigt sich, ob durch die Präparation der Blutkultur massive Zelluntergänge zu verzeichnen sind. Eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose ist allerdings nicht möglich. Werden Zellen nekrotisch und steigt daraufhin die Permeabilität der

Zellmembran, kann Annexin-V-FITC in die Zellen penetrieren, zytoplasmatisch binden und ein durchflusszytometrisches Signal induzieren. Nur anhand einer Gegenfärbung mit Propidiumiodid wäre diese Differenzierung möglich, da Propidiumiodid nur in Zellen mit durchlässiger Membran eindringt.

## Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche als Apoptosemarker

### FACS- Analyse

#### 1. Blutentnahme

3 x 10ml Heparinplasma/Proband

#### 2. Stimulation

3x negativ Kontrolle	3x <b>7,5µl</b> <b>Lipofundin</b>	3x <b>1µl</b> <b>Ketamin</b> 1x	3x <b>10µl</b> <b>Ketamin</b> 10x	3x <b>1µl</b> <b>Ketamin</b> "s" 1x	3x <b>10µl</b> <b>Ketamin</b> "s" 10x	3x <b>1µl</b> <b>Ketamin</b> "r" 1x	3x <b>10µl</b> <b>Ketamin</b> "r" 10x	3x <b>1,5µl</b> <b>Propofol</b> 1x	3x <b>15µl</b> <b>Propofol</b> 10x
----------------------------	---	--	--	---	---	---	---	---	---

vortexen  
1h Vorinkubation  
je ein Aliquot

-
<b>1µl FLMP</b>
<b>5µl LPS (0111 E.coli)</b>

vortexen  
2h Inkubation im Brutschrank mit lose aufgeschraubten Deckeln, 37°C, 6% CO<sub>2</sub>

je <b>0,9µl Brefeldin A-Stammlösung</b> , vortexen
--

4h Inkubation im Brutschrank mit lose aufgeschraubten Deckeln, 37°C, 6% CO<sub>2</sub>

#### 3. Fixierung/ Färbung

<b>2ml FACS-Lysing Solution</b> , vortexen
--

2-5 min bei Raumtemperatur inkubieren

<b>2x 2ml Cellwash ohne Formaldehyd</b> , vortexen
--

8min zentrifugieren bei 350g,  
Überstand dekantieren

3x negativ Kontrolle	3x Lipofundin	3x Ketamin 1x	3x Ketamin 10x	3x Ketamin "s" 1x	3x Ketamin "s" 10x	3x Ketamin "r" 1x	3x Ketamin "r" 10x	3x Propofol 1x	3x Propofol 10x
----------------------------	------------------	---------------------	----------------------	----------------------------	-----------------------------	----------------------------	-----------------------------	----------------------	-----------------------

<b>200µl Cellwash mit Paraformaldehyd</b>
---

je <b>5µL CD14-PC5 Antikörper</b> , vortexen
--

20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren

je <b>5µL Annexin V-FITC Antikörper</b> , vortexen
--

5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubieren

**FACS Messung**

Abb. 16: Versuchsprotokoll Apoptose

### **3.4. statistische Auswertung**

Alle Daten sind in den Tabellen und Graphiken als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt. Die Daten wurden auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnow-Test überprüft. Der Gruppenvergleich erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt vom post-hoc Student-Newman-Keuls Test bei signifikantem Ergebnis. Dabei wurden die einzelnen Messgruppen paarweise miteinander verglichen. Bei fehlender Normalverteilung wurde der Kruskal-Wallis Test (Rangplatzsummen-ANOVA), als verteilungsfreies Analogon zur parametrischen ANOVA durchgeführt, gefolgt vom post-hoc Dunn's-Test zum paarweisen Vergleich bei signifikantem Ergebnis.

Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt.

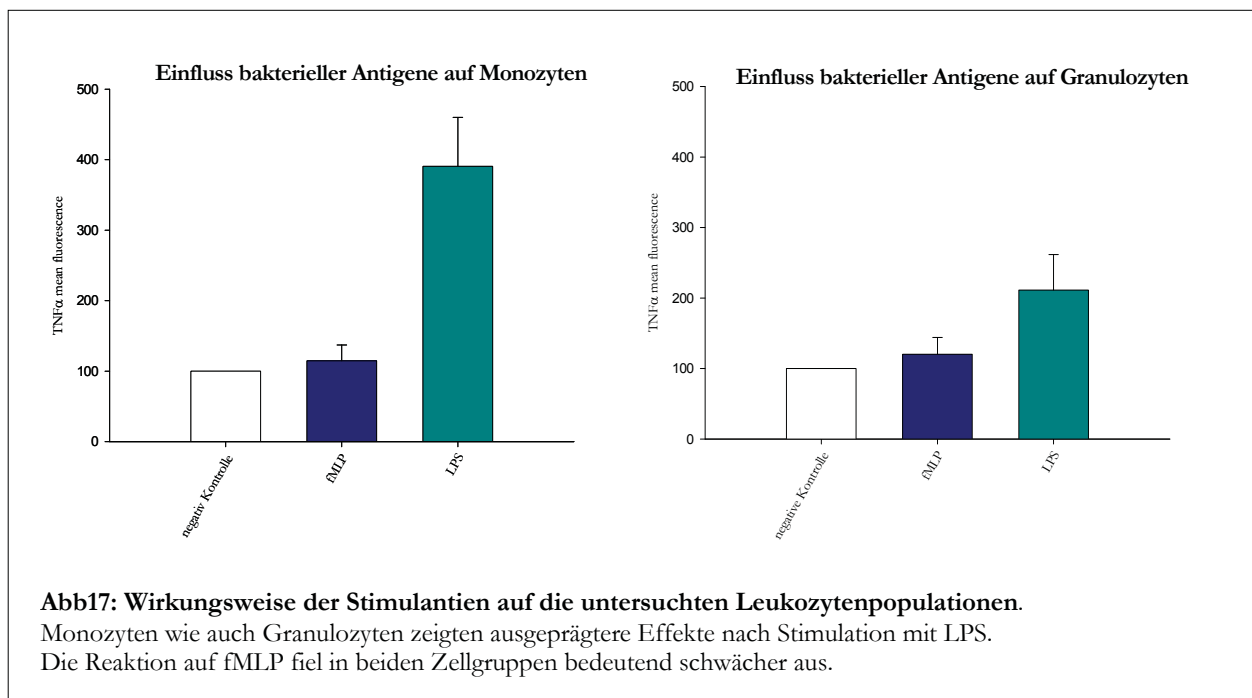


## 4. Auswertung

### 4.1 Analyse der TNF $\alpha$ -Expression nach Applikation intravenöser Anästhetika in Leukozyten mittels Fluoreszenzzytometrie

Experimentelle Studien mit den Anästhetika Ketamin und Propofol zeigten an zirkulierenden mononukleären Zellen des peripheren Blutes gerichtete Modulationen der Immunantwort. Inwieweit sich diese Effekte auf die einzelnen Zelllinien der Leukozyten übertragen lassen, wurde in dieser Dissertation mittels *fluorescence activated cell sorter* (Durchflusszytometer) analysiert.

Die Stimulation mit LPS und fMLP wurde zunächst auf Monozyten und Granulozyten ohne zusätzliche Einwirkung eines Anästhetikums als Negativkontrolle betrachtet. Hierbei war interessant, dass LPS als charakteristisches Monozyten-Stimulans äquivalent eine ausgeprägte Aktivierung in Granulozyten induzierte. FMLP, das zur direkten Stimulation von neutrophilen Granulozyten herangezogen wird, zeigte in unseren Untersuchungen bedeutend geringere Effekte auf Granulozyten als LPS. Monozyten reagierten erwartungsgemäß aufgrund der niedrigen Affinität des FPR1-Rezeptors nur schwach auf dieses Stimulans. Die folgende Abbildung stellt einen Überblick über die Wirkung der verschiedenen Stimulantien auf die untersuchten Leukozytenpopulationen dar (Abb.17).



Lymphozyten, die nicht durch LPS stimuliert werden können, wurden mittels Staphylokokken-Superantigen angeregt. Ähnlich der Untersuchungen an Monozyten unter der Stimulation mit LPS ohne Applikation eines Anästhetikum, zeigte sich eine signifikante Erhöhung der TNF $\alpha$ -Expression in CD4+- und CD8+-Lymphozyten. Weiterhin konnten für sämtliche Teilexperimente keine

signifikanten Veränderungen der basalen TNF $\alpha$ -Expression nach Applikation der ausgewählten Anästhetika ohne bakterielle Stimulation beobachtet werden.

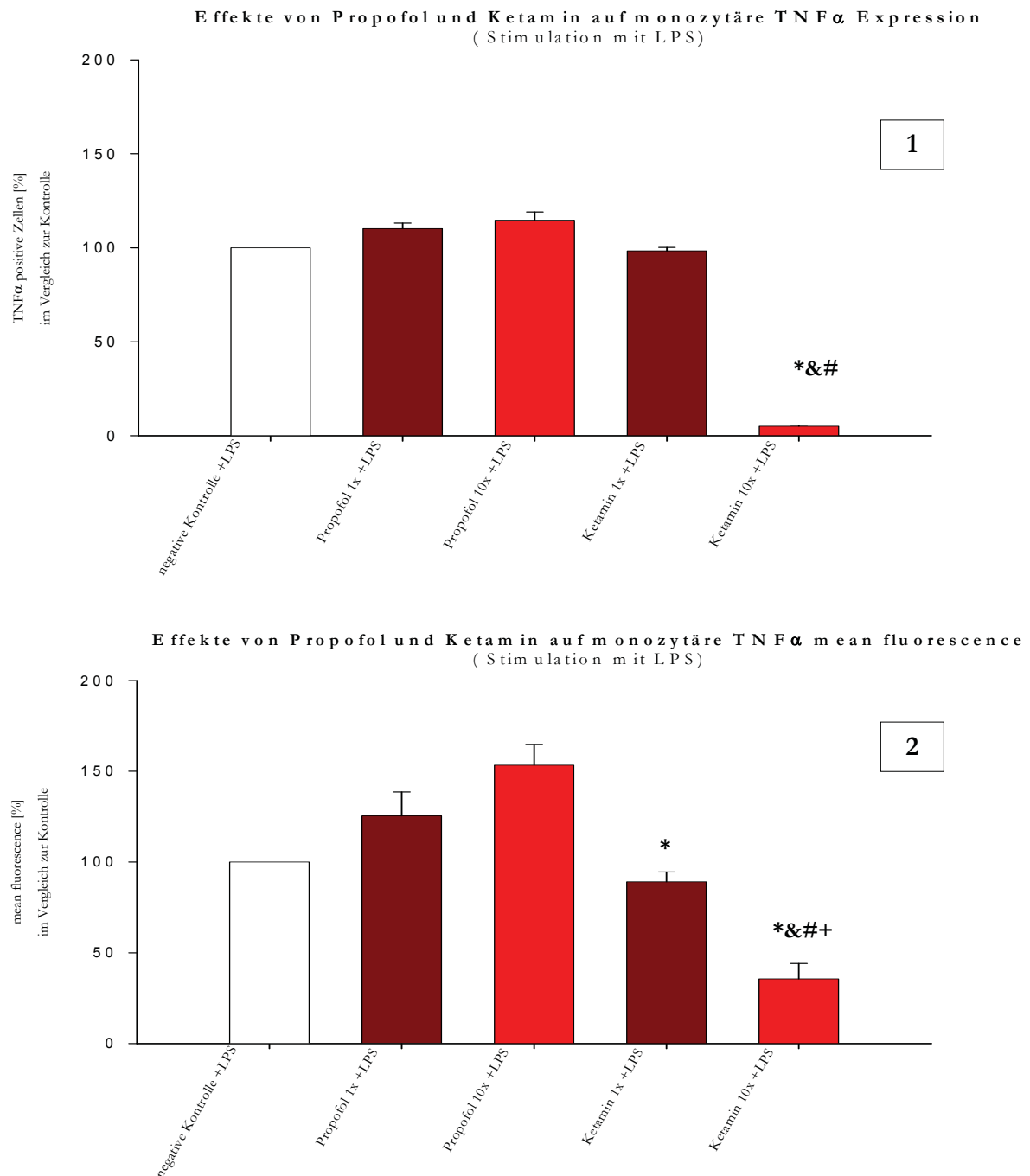
#### **4.1.1 Effekte von Ketamin und Propofol auf die spontane und LPS-stimulierte TNF $\alpha$ -Expression**

In den folgenden Telexperimenten wurden für jede Untersuchung der prozentuale Anteil der TNF $\alpha$ -positiven Zellen gemessen und in der gleichen Versuchsreihe die mittlere Fluoreszenz der TNF $\alpha$ -exprimierenden Zellen erfasst.

##### 4.1.1.1 Monozyten

In Monozyten, die mit dem Oberflächenmarker Anti-CD14-AK markiert wurden, zeigten die Anästhetika Ketamin und Propofol gegensätzliche Effekte auf die TNF $\alpha$ -Expression nach Stimulation mit LPS (Abb.18-1). Dabei konnte in Anwesenheit von Ketamin eine Abnahme der LPS-stimulierten TNF $\alpha$ -Antwort verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich unter Präsenz von Propofol eine Zunahme dieser TNF $\alpha$ -Expression. Nach Applikation klinischer Konzentrationen stellten sich allerdings nur geringfügige Differenzen zur Negativkontrolle dar. Demgegenüber zeigte sich eine deutliche Suppression der Monozyten vor allem unter pharmakologischer Dosierung von Ketamin. Die Steigerung der TNF $\alpha$ -Expression nach Applikation von 10-fach höher dosiertem Propofol war geringer ausgeprägt. Bezeichnender konnte der Effekt der gerichteten Immunmodulation durch die Anästhetika Ketamin und Propofol mittels *mean fluorescence* (mittlere Fluoreszenzintensität) der TNF $\alpha$ -positiven Zellen gezeigt werden (Abb.18-2). Bei der mittleren Fluoreszenz konnten wir diese gerichteten Resultate bereits bei klinisch relevanten Konzentrationen der Anästhetika feststellen.

Eine spontane Modulation der basalen TNF $\alpha$ -Expression nach Applikation von Propofol und Ketamin konnte nicht dargestellt werden.



**Abb 18: Effekte von Ketamin und Propofol auf die monozytäre TNF- $\alpha$ -Expression**

Die Anästhetika Propofol und Ketamin wurden in klinischer und pharmakologischer Konzentration im Vollblutansatz für eine Stunde vorinkubiert. Anschließend mit LPS (1 $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach weiteren 2h Inkubation wurde der Proteintransfer mit Brefeldin A geblockt. Nach Lyse der Erythrozyten und Markierung mit den Antikörpern CD14 (zur Markierung der Monozytenpopulation) und TNF $\alpha$  wurde die intrazelluläre TNF $\alpha$ -Expression mittels FACS analysiert.

**Abb 18-1:** zeigt den Prozentsatz der TNF $\alpha$  positiven Zellen

**Abb 18-2:** zeigt die mean fluorescence der TNF $\alpha$  positiven Zellen

Die Kontrollansätze ohne Medikament und mit LPS sind jeweils 100% gesetzt.

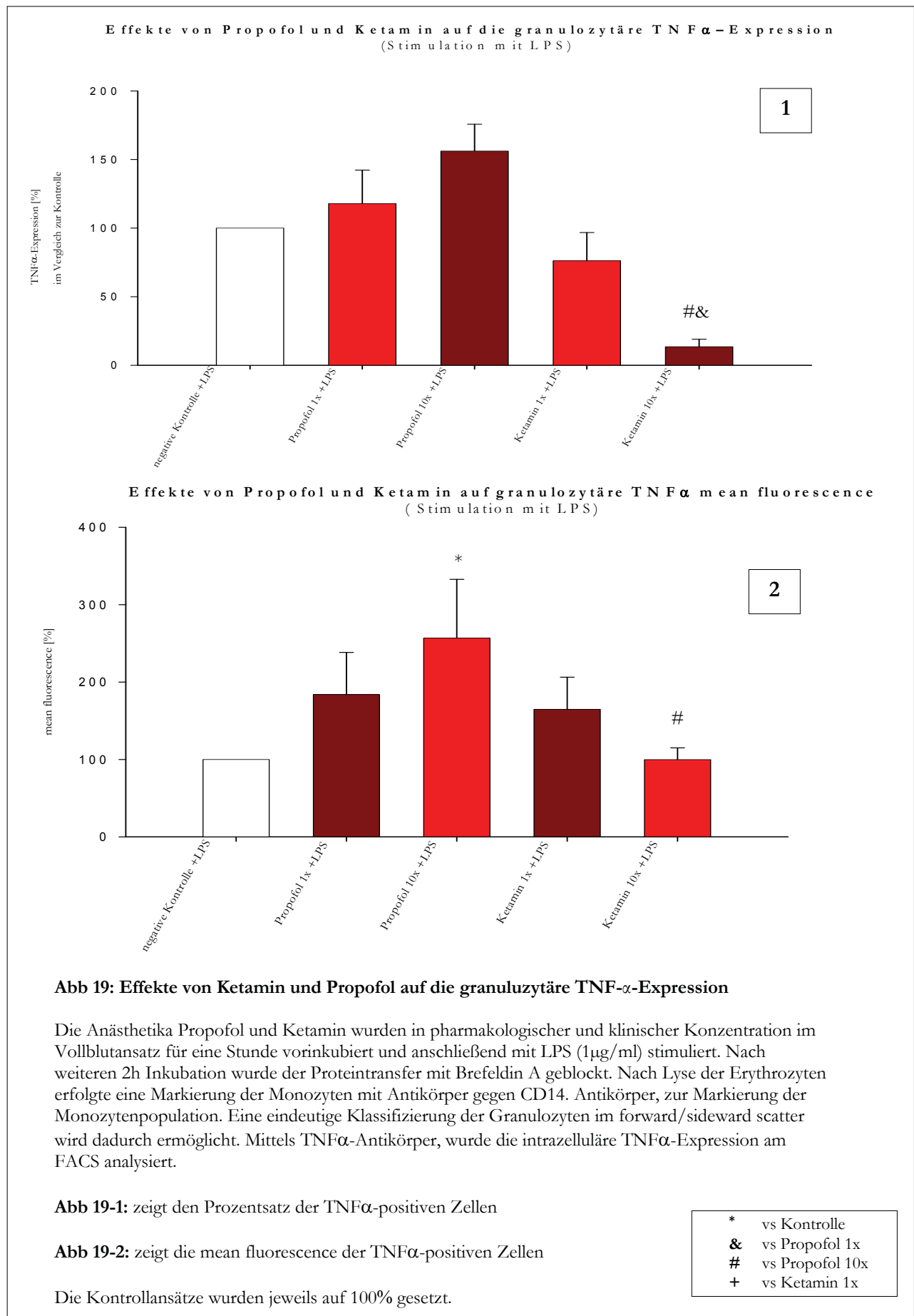
*	vs Kontrolle
&	vs Propofol 1x
#	vs Propofol 10x
+	vs Ketamin 1x

#### 4.1.1.2 Granulozyten

Äquivalente Effekte ließen sich hinsichtlich der Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  im kultiviertem Vollblut nach Stimulation mit LPS auch bei Granulozyten quantifizieren. Granulozyten besitzen keine zellspezifischen Oberflächenrezeptoren. Infolgedessen ist die Markierung und Messung dieser Zellpopulation direkt nicht möglich. Dementsprechend wurden die Monozyten mit Anti-CD14-AK isoliert dargestellt und im *forward/sideward scatter* von den Granulozyten subtrahiert.

Auffallend ist, dass bereits klinische Konzentrationen an Anästhetika Effekte der gerichteten Immunmodulation zeigen. Propofol steigert die Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  bereits bei klinisch relevanten Konzentrationen. Ketamin zeigt in dieser Dosierung jedoch eine leichte Steigerung. Unter Verwendung der zehnfachen Konzentration war eine gerichtete Modulation eindeutig zu beobachten (Abb.19-1).

Beide Medikamente zeigen auch in klinischen Konzentrationen eine Steigerung der mittleren Fluoreszenz  $\text{TNF}\alpha$ -positiver Granulozyten. In pharmakologischen Konzentrationen stellte sich nur bei Propofol ein weiterer Zuwachs dieser Fluoreszenz dar. Ketamin zeigte keine suppressiven Effekte, wodurch sich bei dieser Einzeluntersuchung die adversative Modulation der Immunreaktion nicht bestätigt (Abb.19-2).



#### **4.1.2 Effekte von Ketamin und Propofol auf die spontane und fMLP-stimulierte TNF $\alpha$ -Expression**

Bei der Stimulation von Leukozyten mit fMLP beobachtet man insgesamt geringere Effekte nach Applikation von Propofol und Ketamin. Nähere Erörterungen zur TNF $\alpha$ -Liberation und *mean fluorescence* der einzelnen Subpopulationen der Leukozyten werden in folgenden Abschnitten gesondert erläutert.

##### 4.1.2.1 Monozyten

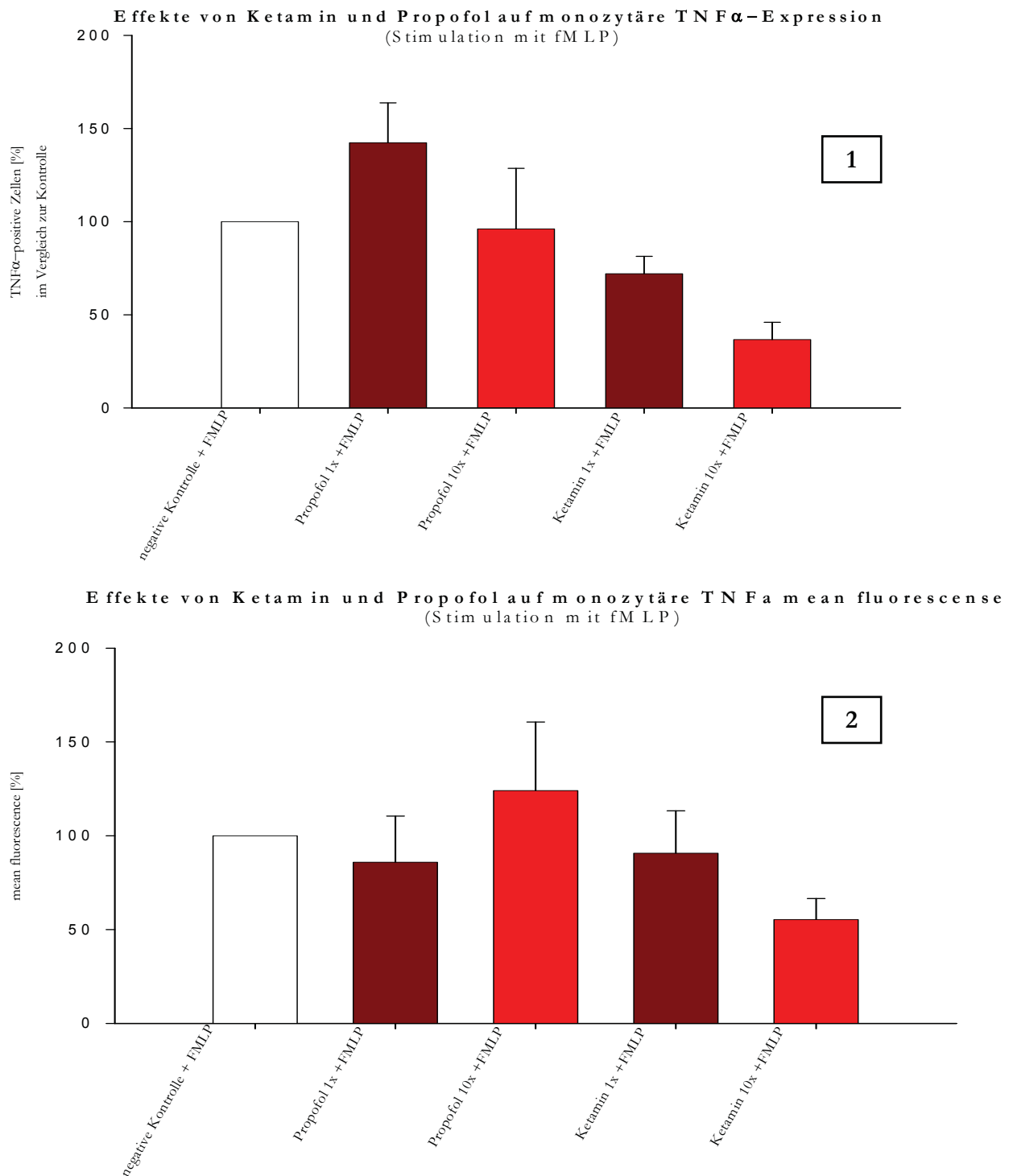
Der Plot zur TNF $\alpha$ -Expression zeigt für klinische Konzentrationen von Propofol eine Steigerung, die unter pharmakologischen Konzentrationen nicht nachweisbar ist. Ketamin verhält sich äquivalent zu den Untersuchungen mit LPS. Hierbei ist bereits unter einfacher Ketaminkonzentration ein Abfall der Expression erkennbar. Unter zehnfacher Konzentrierung ist die Suppression der TNF $\alpha$  Liberation noch intensiver (Abb. 20-1).

Durch Illustration der TNF $\alpha$  *mean fluorescence* in Monozyten präsentiert sich ein analoges Bild wie nach Endotoxin-induzierter TNF $\alpha$ -Expression. Während klinische Konzentrationen beider Anästhetika keine signifikante Effekte der mittleren Fluoreszenz erkennen lassen, zeigen pharmakologische Konzentrationen nach Applikation der beiden Anästhetika und Stimulation mit fMLP die typischen adversativen Effekte der Immunmodulation im Vergleich zur Negativkontrolle. Quantitativ sind die Effekte auf Monozyten im Vergleich zur Stimulation mit LPS deutlich geringer (Abb 20-2).

##### 4.1.2.2 Granulozyten

Granulozyten besitzen neben FPR1 Rezeptoren auch FPR2-Rezeptoren die eine etwa 1000-fach höhere Äffinität aufweisen. fMLP zeichnet sich aus diesem Grund als direktes Stimulans von neutrophilen Granulozyten aus und wird in diesem Telexperiment gesondert betrachtet.

Der Effekt der beiden Anästhetika Propofol und Ketamin zeigt auf die fMLP stimulierte TNF $\alpha$  Freisetzung in Granulozyten sowie deren *mean fluorescence* keine Regulation (Abb 21-1/2).



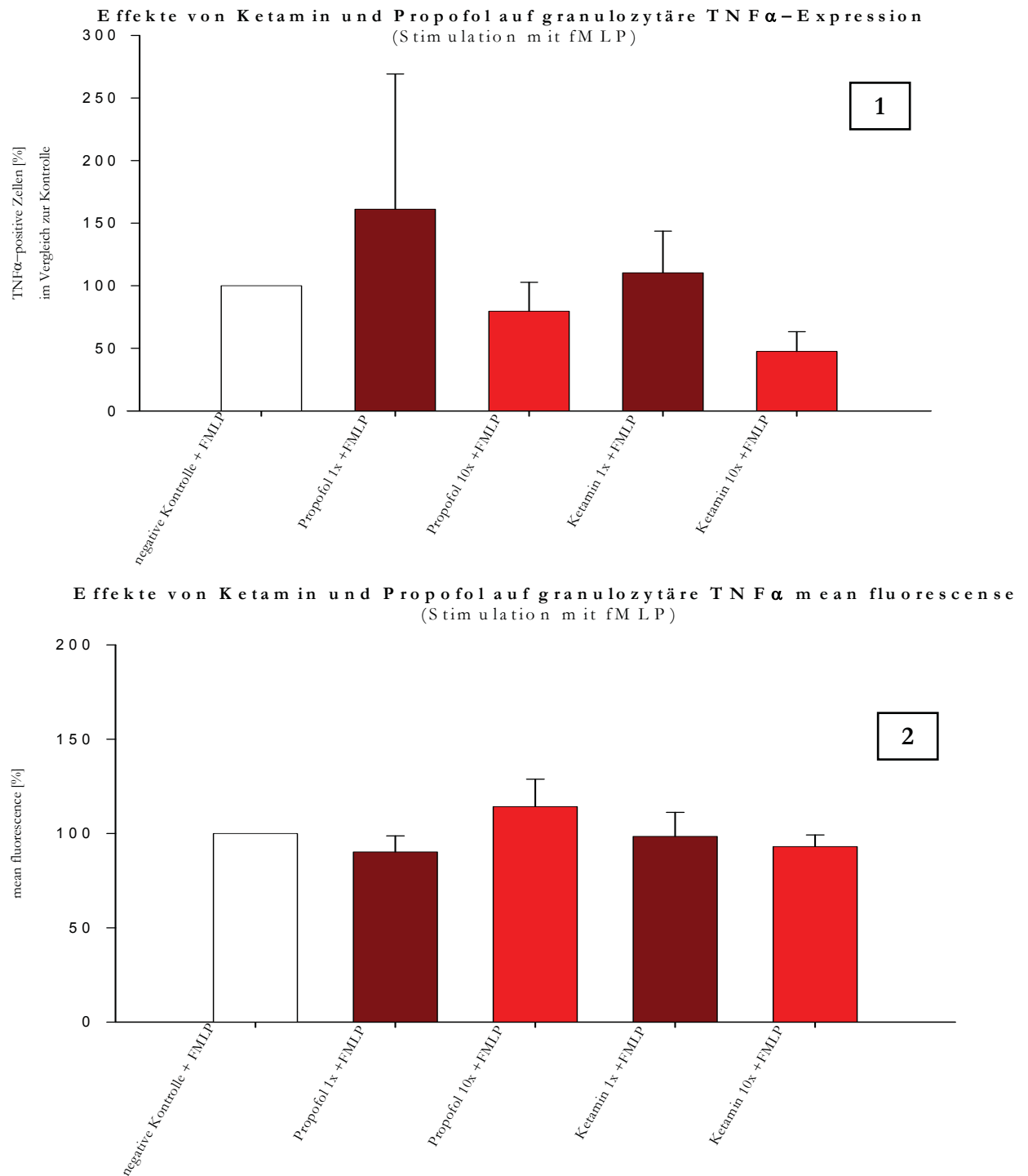
**Abb 20: Effekte von Ketamin und Propofol auf die monozytäre TNF- $\alpha$ -Expression**

Die Anästhetika Propofol und Ketamin wurden in pharmakologischer und klinischer Konzentration im Vollblutansatz für eine Stunde vorinkubiert, anschließend mit fMLP ( $10^{-6}$ ) stimuliert. Nach weiteren 2h Inkubation wurde der Proteintransfer mit Brefeldin A geblockt. Nach Lyse der Erythrozyten und Markierung mit CD 14-Antikörper und TNF $\alpha$ , wurde die intrazelluläre TNF $\alpha$ -Expression mittels FACS analysiert.

**Abb 20-1:** zeigt den Prozentsatz der TNF $\alpha$ -positiven Zellen

**Abb 20-2:** zeigt die mean fluorescence der TNF $\alpha$ -positiven Zellen

Die Kontrollansätze wurden jeweils auf 100% gesetzt.



**Abb 21: Effekte von Ketamin und Propofol auf die granulozytäre TNF- $\alpha$ -Expression**

Die Anästhetika Propofol und Ketamin wurden in pharmakologischer und klinischer Konzentration im Vollblutansatz für eine Stunde vorinkubiert, anschließend mit **fMLP** ( $10^{-6}$ ) stimuliert. Nach weiteren 2h Inkubation wurde der Proteintransfer mit Brefeldin A geblockt. Nach Lyse der Erythrozyten und Markierung mit CD 14-Antikörper und TNF $\alpha$ , wurde die intrazelluläre TNF $\alpha$ -Expression/mean fluorescence mittels FACS analysiert.

**Abb 21-1:** zeigt den Prozentsatz der TNF $\alpha$ -positiven Zellen

**Abb 21-2:** zeigt die mean fluorescence der TNF $\alpha$ -positiven Zellen

Die Kontrollansätze wurden jeweils auf 100% gesetzt.

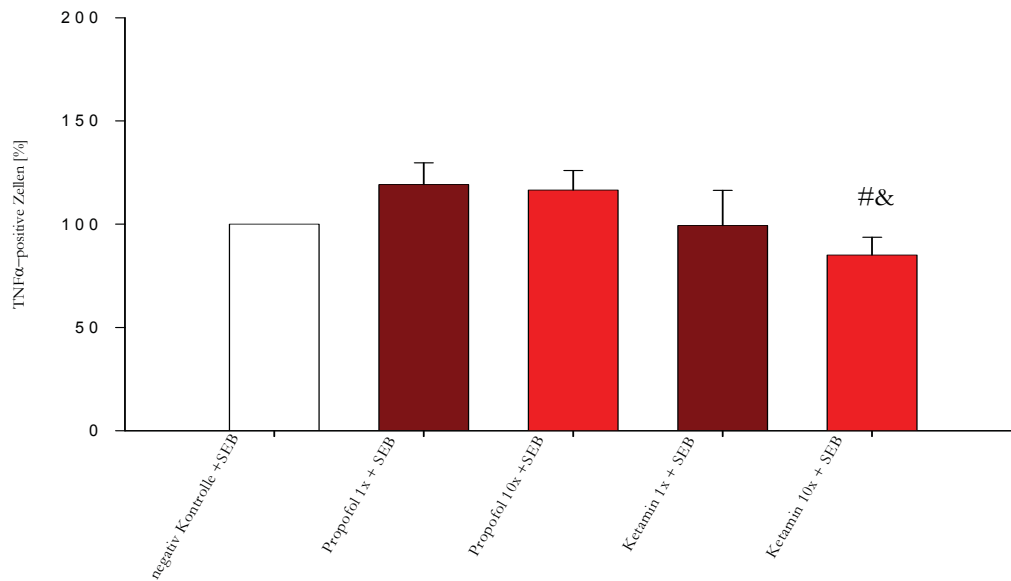


#### **4.1.3 Effekte von Ketamin und Propofol auf die spontane und SEB stimulierte TNF $\alpha$ Expression in Lymphozyten**

Während LPS nicht in der Lage ist, die Expression von TNF $\alpha$  in CD4- und CD8-positiven Lymphozyten zu steigern, zeigte die Stimulation mit Staphylokokken-Superantigen einen deutlichen Zuwachs in der Freisetzung dieses Zytokins (Abb.22-1).

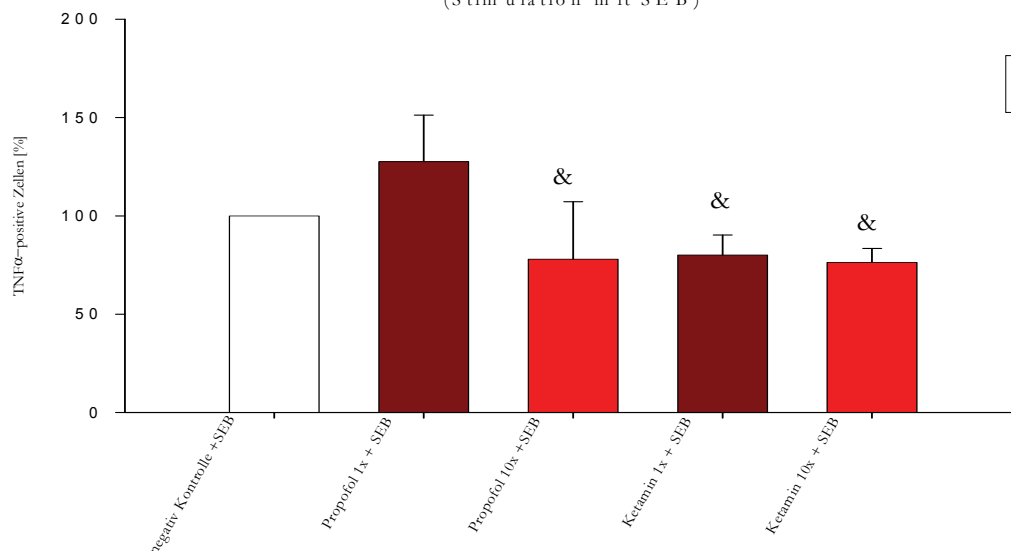
Nach zusätzlicher Applikation der Narkotika Ketamin und Propofol stellten sich allerdings im Vergleich zu Monozyten nach Endotoxin-Stimulation nur dezente nicht signifikant gegensätzliche Modulationen der Zellpopulation dar (Abb. 22-2).

### Effekte von Propofol und Ketamin auf die TNF $\alpha$ -Expression in CD4-positiven Lymphozyten (Stimulation mit SEB)



1

### Effekte von Propofol und Ketamin auf die TNF $\alpha$ -Expression in CD8-positiven Lymphozyten (Stimulation mit SEB)



2

**Abb. 22: Effekte von Ketamin und Propofol auf die lymphozytäre TNF $\alpha$ - Expression**

Die Anästhetika Propofol und Ketamin wurden in klinischer und pharmakologischer Konzentration im Vollblutansatz für eine Stunde vorinkubiert. Anschließend mit SEB und den Costimulatoren CD28 und CD49 stimuliert. Nach weiteren 2h Inkubation wurde der Proteintransfer mit Brefeldin A geblockt. Nach Lyse der Erythrozyten und Markierung mit den Antikörpern gegen CD69, CD4 und CD8 wurden die beiden Subpopulationen der Lymphozyten markiert. Mittels Anti-TNF $\alpha$  wurde die intrazelluläre TNF $\alpha$ -Expression des durchflusszytometrischen Assays quantifiziert.

**Abb 22-1:** zeigt den Prozentsatz des Mittelwertes der TNF $\alpha$  positiven CD4 Lymphozyten

**Abb 22-2:** zeigt den Prozentsatz des Mittelwertes der TNF $\alpha$  positiven CD8 Lymphozyten

Die Kontrollansätze wurden jeweils auf 100% gesetzt.

& Propofol 1x  
# Propofol 10x

#### **4.1.4 Effekte des Zusatzstoffes Intralipid auf die spontane und stimulierte TNF $\alpha$ - Expression**

Intralipid (Lipofundin), das als Zusatzstoff in der Propofolemulsion enthalten ist, wurde in unseren Untersuchungen nochmals gesondert betrachtet. Aufgrund einer hohen Anfälligkeit für bakterielle Kontamination und der sich daraus ergebenden Gefahr der Verfälschung unserer Ergebnisse, verwendeten wir stets eine neue Emulsion und führten zusätzlich in allen Untersuchungen eine Probe mit. In unserer Arbeit konnte das Sojamilchpräparat keinen signifikanten Anstieg der basalen Plasmakonzentration von TNF $\alpha$  induzieren. Auch eine Modulation der Endotoxin-stimulierten Zytokinantwort wurde nicht beobachtet.

#### **4.1.5 Effekte des Racemats Ketamin im Vergleich zu seinen Enantiomeren Ketamin „r“ und „s“ auf die spontane und stimulierte TNF $\alpha$ -Expression**

Aufgrund zahlreicher pharmakologischer Differenzen zwischen Ketamin und seinen Enantiomeren, sollen in dieser Arbeit unterschiedliche immunmodulatorische Effekte nach bakteriellen Stimuli zwischen den Ketaminen „r“ und „s“ im Vergleich zum Racemat aufgedeckt werden.

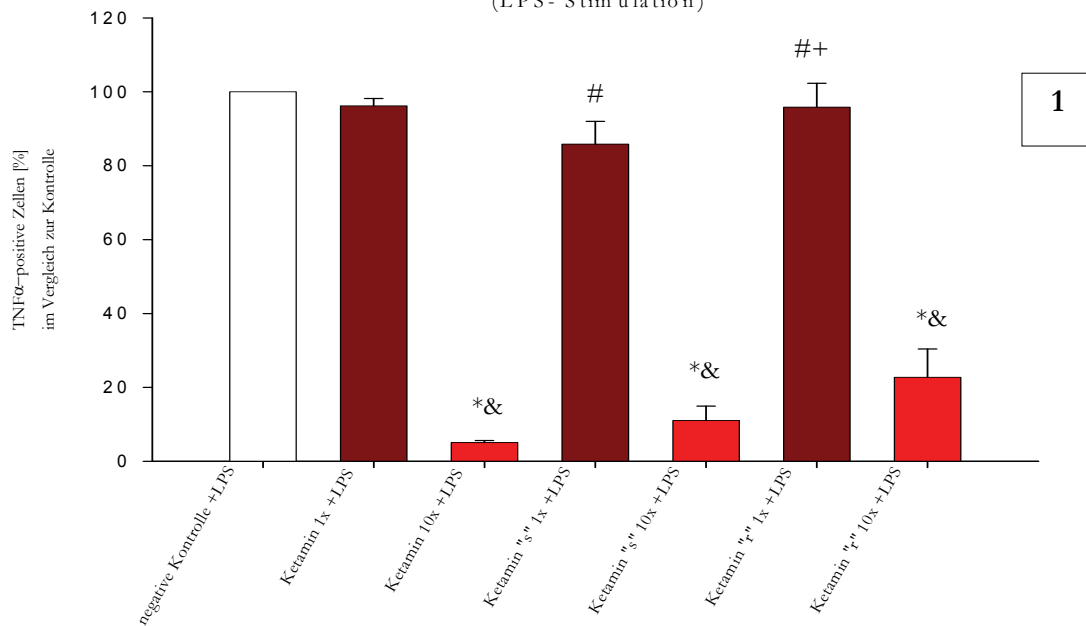
Inwieweit die gerichtete Suppression unter Applikation der einzelnen Enantiomere Ketamin „r“ und „s“ erreicht werden kann, wurde äquivalent zu den vorhergehenden Untersuchungen mit dem BD-Protokoll für intrazelluläre Zytokinmessung geprüft. Analog zum Racemat wurden klinische und pharmakologische Konzentrationen gegenübergestellt. Lymphozyten wurden in diesem Experiment nicht untersucht.

##### 4.1.5.1 Monozyten

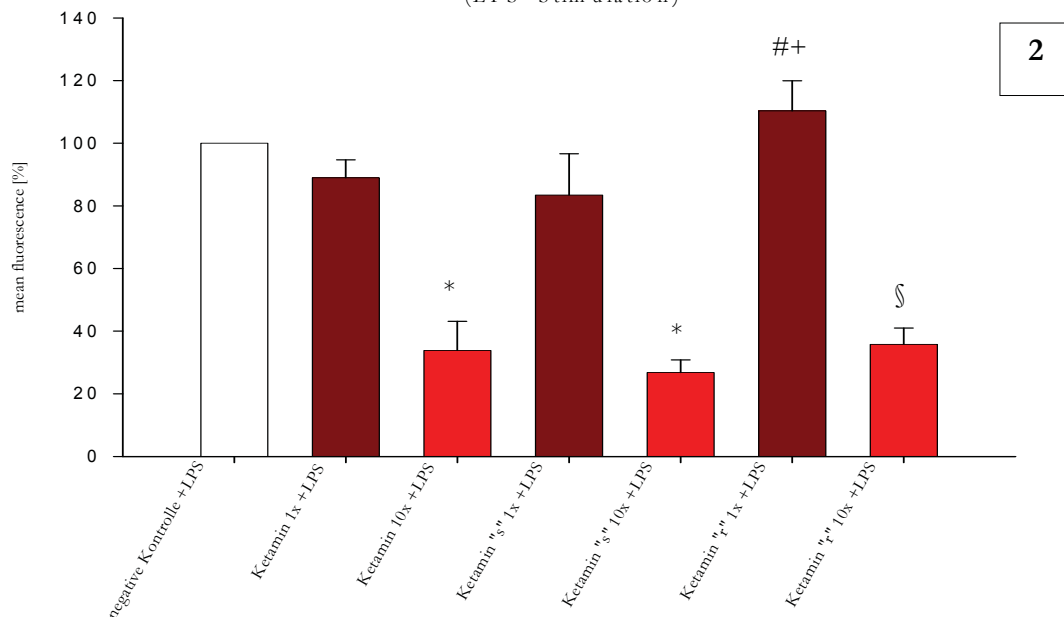
Analog zu den Untersuchungen am Racemat Ketamin zeichnet sich eine Suppression der TNF $\alpha$ -Expression auch in seinen Diastereomeren ab. Während klinische Konzentrationen kaum einen Einfluss auf die Expression und die mittlere Fluoreszenz zeigen, ist bei allen Ketaminvariationen eine deutliche Abnahme unter pharmakologischen Konzentrationen zu verzeichnen. Sowohl bei der TNF $\alpha$ -Expression als auch bei der *mean fluorescence* verhielten sich die unterschiedlichen Variationen von Ketamin nahezu identisch.

Abbildung 23 präsentiert zusammengestellt die Modulation der monozytären TNF $\alpha$  Expression auf transkriptionaler Ebene unter dem Einfluss der verschiedenen Ketamine nach Stimulation mit LPS.

**Einfluss von Ketamin als Racemat im Vergleich zu den Enantiomeren Ketamin „r“ und „s“ auf die monozytäre TNF $\alpha$ -Expression (LPS-Stimulation)**



**Einfluss von Ketamin als Racemat im Vergleich zu den Enantiomeren Ketamin „r“ und „s“ auf monozytäre mean fluorescence (LPS-Stimulation)**



**Abb 23: Effekte von Ketamin als Racemat im Vergleich zu den Enantiomeren Ketamin „r“ und „s“ auf die monozytäre TNF $\alpha$ -Expression und mean fluorescence**

Die Anästhetika wurden in klinischer und pharmakologischer Konzentration im Vollblutansatz für eine Stunde vorinkubiert, anschließend mit LPS (1 $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach weiteren 2h Inkubation wurde der Proteintransfer mit Brefeldin A geblockt. Nach Lyse der Erythrozyten und Markierung mit CD14-Antikörper (zur Markierung der Monozytenpopulation) und TNF $\alpha$ , wurde die intrazelluläre TNF $\alpha$ -Expression/mean fluorescence mittels FACS analysiert.

**Abb 23-1:** zeigt den Prozentsatz der TNF $\alpha$ -positiven Zellen

**Abb 23-2:** zeigt die mean fluorescence der TNF $\alpha$ -positiven Zellen

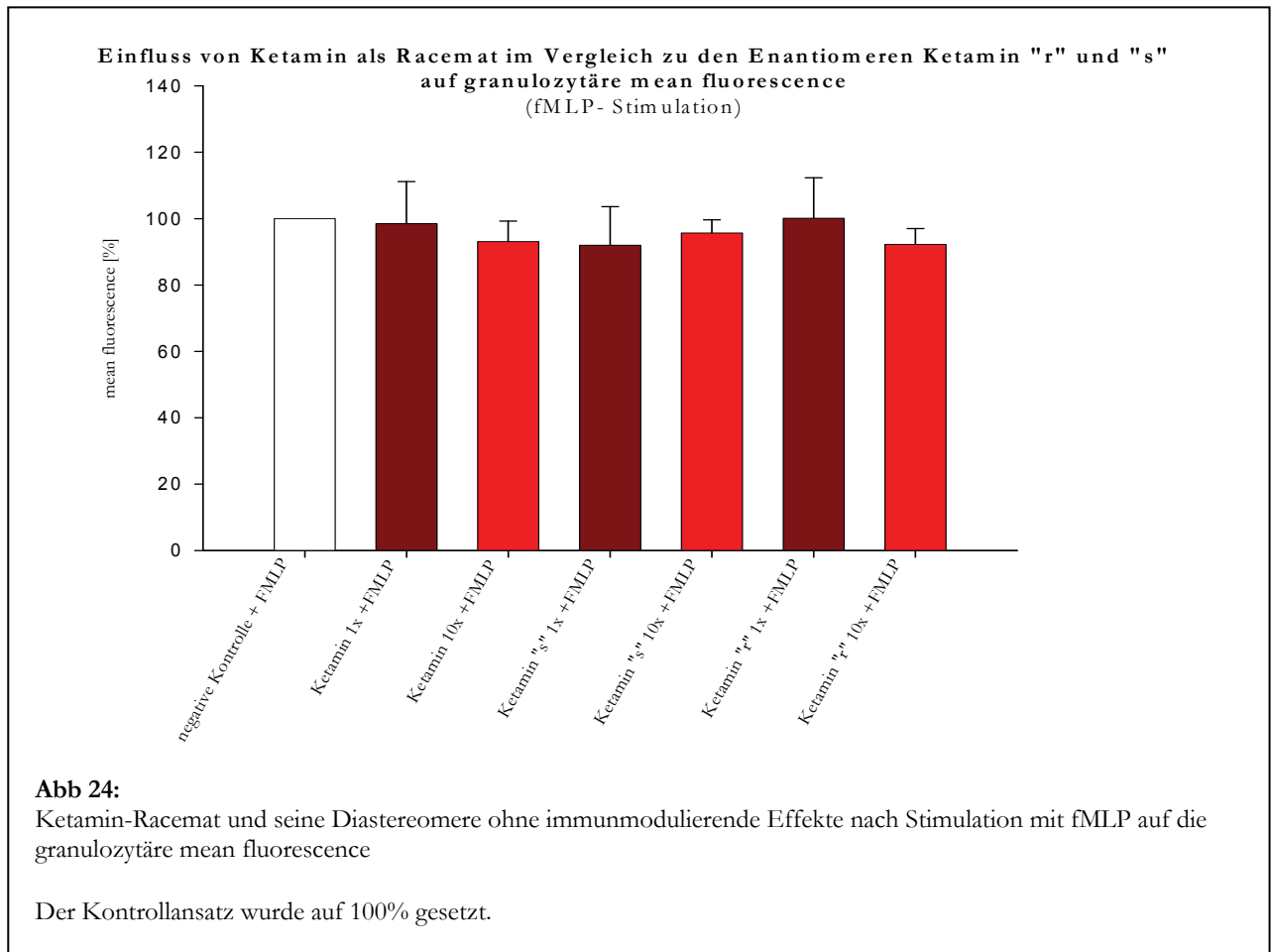
Die Kontrollansätze wurden jeweils auf 100% gesetzt.

- \* vs Kontrolle
- & vs Ketamin 1x
- # vs Ketamin 10x
- + vs Ketamin s 10x
- § vs Ketamin r 1x

#### 4.1.5.2 Granulozyten

Neutrophile weisen eine sehr verzögerte spontane Aktivierung auf.

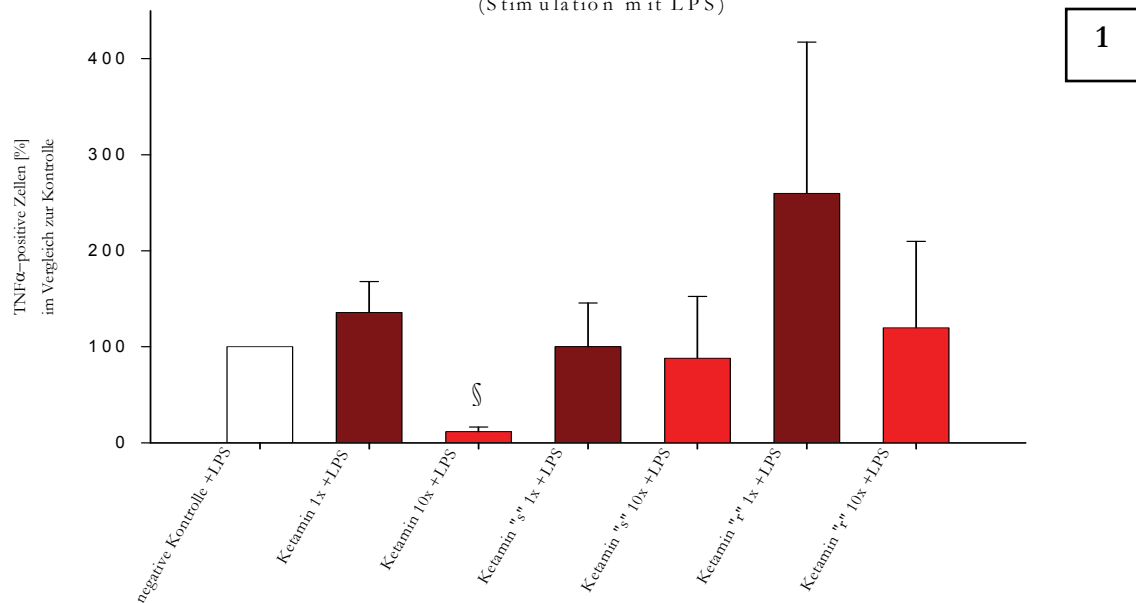
In dieser Untersuchung zeigten die Granulozyten nach Stimulation mit fMLP und nach zusätzlicher Applikation von Ketamin in verschiedenen Variationen und Dosierungen keine Effekte (Abb. 24).



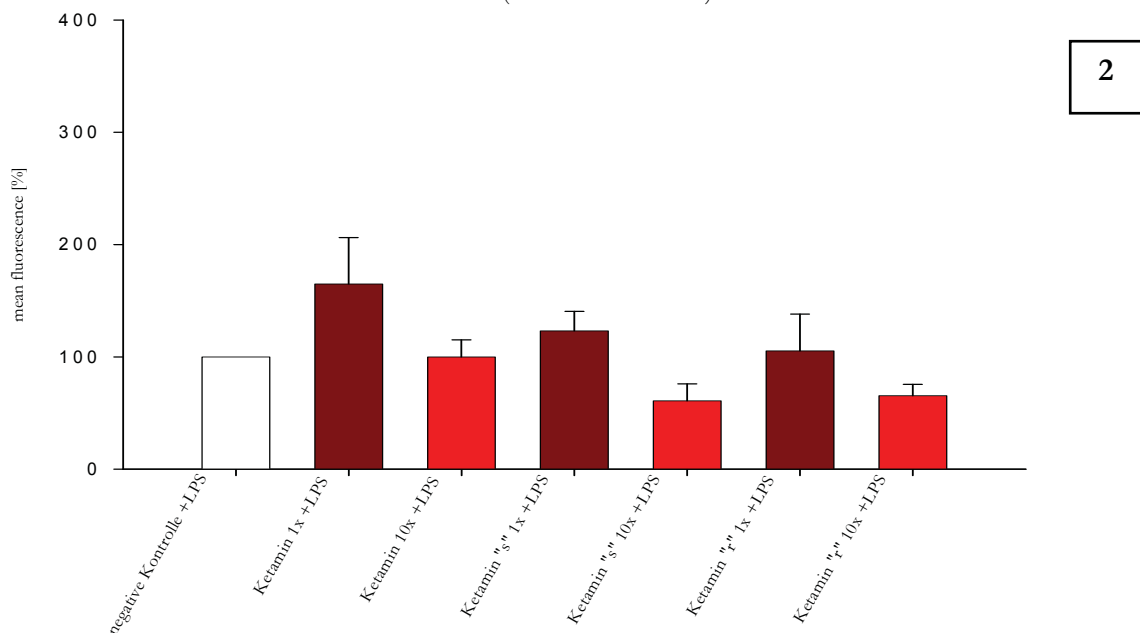
Aufgrund ihrer positiven CD14-Untereinheit und ihrer ausgeprägteren Reaktion auf bakterielles Endotoxin, führten wir analog zu dieser Untersuchung ein Telexperiment mit LPS durch. Klinische Konzentrationen aller drei untersuchten Medikamente zeigen einen Anstieg der mean fluorescence unter Endotoxinstimulation. Die Suppression unter pharmakologischen Bedingungen, wie sie in anderen Telexperimenten beobachtet wurde, konnte auch bei den Enantiomere festgestellt werden (Abb 25-2).

Der prozentuale Anteil  $\text{TNF}\alpha$ -positiver Zellen unter Stimulation mit Endotoxin zeigte dagegen ungerichtete Resultate (Abb 25-1).

**Einfluss von Ketamin als Racemat im Vergleich zu den Enantiomeren Ketamin "s" und "r" auf granulozytäre TNF $\alpha$ -Expression (Stimulation mit LPS)**



**Einfluss von Ketamin als Racemat im Vergleich zu den Enantiomeren Ketamin "r" und "s" auf granulozytäre mean fluorescence (LPS-Stimulation)**



**Abb 25: Effekte von Ketamin als Racemat im Vergleich zu den Enantiomeren Ketamin „r“ und „s“ auf die granulozytäre TNF- $\alpha$ -Expression und mean fluorescence**

Die Anästhetika wurden in klinischer und pharmakologischer Konzentration im Vollblutansatz für eine Stunde vorinkubiert. Anschließend mit LPS (1 $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach weiteren 2h Inkubation wurde der Proteintransfer mit Brefeldin A geblockt. Nach Lyse der Erythrozyten und Markierung mit CD14-Antikörper (zur Markierung der Monozytenpopulation) und TNF $\alpha$ , wurde die intrazelluläre TNF $\alpha$  Expression/mean fluorescence mittels FACS analysiert.

**Abb 25-1:** zeigt den Prozentsatz der TNF $\alpha$ -positiven Zellen

**Abb 25-2:** zeigt die mean fluorescence der TNF $\alpha$ -positiven Zellen

§ vs Ketamin r 1x

Die Kontrollansätze wurden jeweils auf 100% gesetzt.

**Resultat:** Zusammenfassend kann man sagen, dass die Anästhetika Ketamin und Propofol gerichtete immunmodulatorische Effekte nach bakterieller Stimulation präsentieren. Ketamin supprimiert dosisabhängig die  $\text{TNF}\alpha$ -Akkumulation in Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten. Propofol hingegen steigert die  $\text{TNF}$ - Expression nach zusätzlicher bakterieller Aktivierung des Immunsystems.

Trotz der zahlreichen Unterschiede vom Racemat und den Enantiomeren von Ketamin in Pharmakodynamik und Pharmakokinetik zeigten unsere Untersuchungen zur bakteriell stimulierten  $\text{TNF}\alpha$ - Expression in Leukozyten keine wesentlichen Differenzen. Eine suppressive Modulation nach Stimulation mit bakteriellem Endotoxin war in allen Ketaminen bei zehnfacher Konzentration in Monozyten eindeutig zu verzeichnen.

## **4.2 Analyse der $\text{TNF}\alpha$ -Expression nach Applikation intravenöser Anästhetika in Leukozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie**

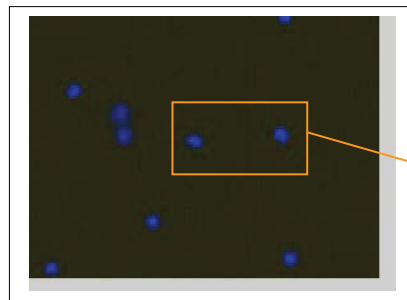
Gegensätzliche Modulationen der Immunantwort durch die Anästhetika Ketamin und Propofol konnten in verschiedenen experimentellen Untersuchungen nachgewiesen werden. Zur Ergänzung unserer Analysen am *fluorescence activated cell sorter* (FACS) sollten mittels Fluoreszenzmikroskopie besonders qualitative Akzente unterstrichen werden. Qualitativer Aspekt dieser Untersuchung stellt dabei die DAPI Färbung dar, durch die es ermöglicht wird, die einzelnen Zellpopulationen an ihrer Kernmorphologie differenzieren zu können.

### **4.2.1 Effekte der Leukozyten auf die spontane und LPS-stimulierte $\text{TNF}\alpha$ -Expression**

Äquivalent zu den Untersuchungen am FACS zeigen Leukozyten, insbesondere Monozyten, nach Stimulation mit LPS eine deutliche Zunahme der  $\text{TNF}\alpha$  Expression (Anti- $\text{TNF}$ -alpha-FITC positiv) (siehe Vergleich Abb. Y 25-I, 25-II). Während Monozyten (Anti-CD14-PC5 positiv) die markanteste Gradation nach Endotoxin-Reiz zeigen, sind zusätzlich dezente Effekte dieser Zytokin Sekretion bei Granulozyten (Anti-CD14-PC5 *subset* positiv) eruierbar. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnten bei dieser Arbeit qualitativ die inflammatorische Aktivierbarkeit unter dem Einfluss von bakteriellem Endotoxin innerhalb der verschiedenen Leukozytenpopulationen dargestellt werden. Aussagen über die Steigerung der mittleren Fluoreszenz sind mit dieser Untersuchungsmethode nicht möglich, da trotz identischer Belichtungsbedingungen Überstrahlungen getriggert werden, die durch die Software nicht kompensiert werden.

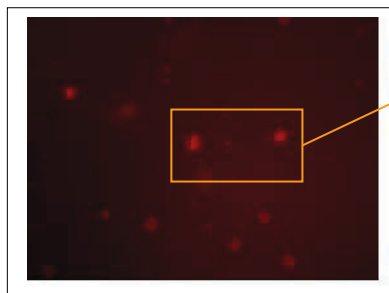
Darstellung der Leukozyten ohne Stimulation mit Endotoxin (LPS)

I

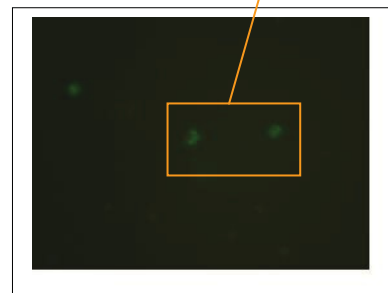


DAPI

**Monozyten mit nur  
dezentrier TNF $\alpha$   
Produktion**  
(ohne Stimulation mit LPS)



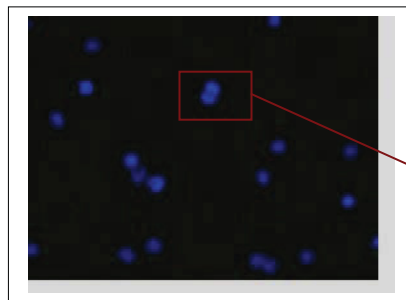
Anti-CD14-PC5



Anti-TNF-alpha FITC

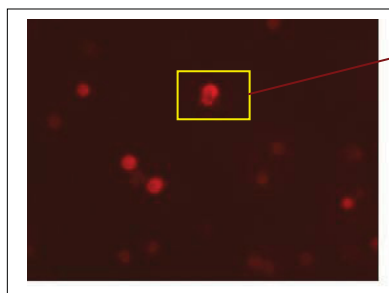
Darstellung der Leukozyten mit Stimulation durch Endotoxin (LPS)

II

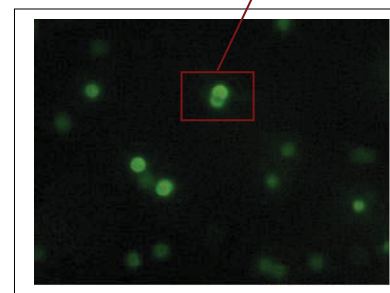


DAPI

**TNF $\alpha$  produzierender  
Monozyt**  
(Stimulation mit LPS)



Anti-CD14-PC5



Anti-TNF-alpha-FITC

Abb 26: leukozytäre TNF- $\alpha$ -Expression vor (I) und nach (II) Endotoxin-Stimulation mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Färbung mit DAPI, Anti-TNF-alpha-FITC und Anti-CD14-PC5

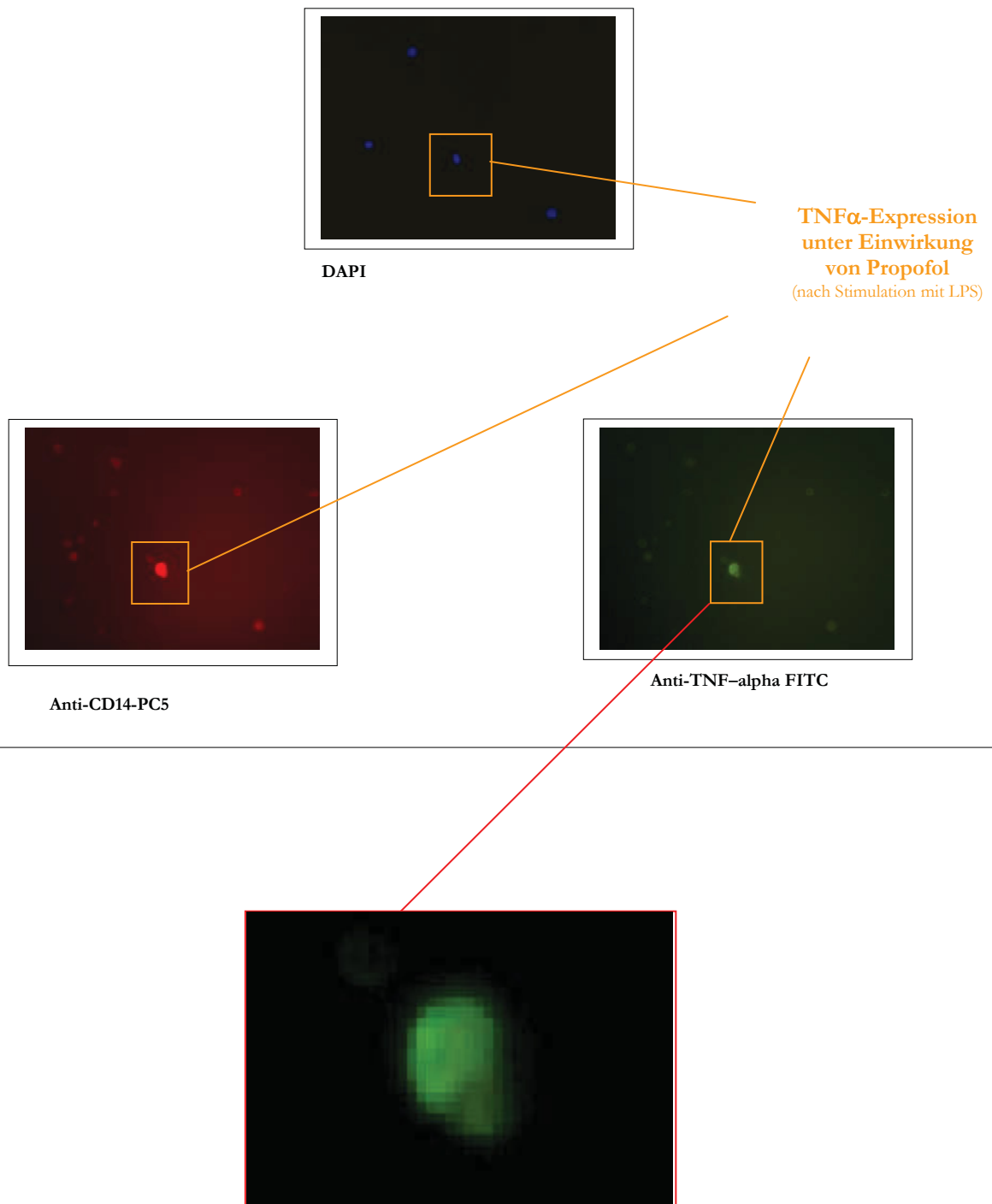


#### **4.2.2 Effekte von Ketamin und Propofol auf die spontane und LPS-stimulierte TNF $\alpha$ -Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie**

Inwieweit die gerichtete Modulation der Immunantwort unter den Anästhetika Ketamin und Propofol durch Fluoreszenzmikroskopie ergänzt werden kann, sollte in diesem Telexperiment erörtert werden. Die beiden Anästhetika wurden jeweils in pharmakologischer (10x) Konzentrierung dem *buffy coat* zugesetzt und vor der Weiterverarbeitung 1h inkubiert. Die weitere Aufbereitung dieser Proben erfolgte simultan zur vorhergehenden Untersuchung.

Wie die folgenden Abbildungen (Abb 27, 28) zeigen, erhielten wir kein aussagekräftiges Ergebnis über eine mögliche Steigerung der TNF $\alpha$ -Expression durch Propofol bzw. eine Suppression durch Ketamin. Nach Applikation des Anästhetikums Propofol lässt sich eine homogene TNF $\alpha$ -Expression erkennen, während im Vergleich dazu Ketamin bei genauerer Betrachtung unter dem Einfluss von Endotoxin eine inhomogene Morphologie TNF $\alpha$  Expression zeigt.

Effekte von Propofol auf die leukozytäre TNF $\alpha$ -Expression nach Stimulation mit Endotoxin (LPS)



**Abb 27:** Effekte von Propofol auf die leukozytäre TNF- $\alpha$ -Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Färbung mit DAPI, Anti-TNF-alpha-FITC und Anti-CD14-PC5

Vergrößerungsausschnitt zeigt eine homogene Färbung von Monozyten mit Anti-TNF-alpha-FITC, (Cave: Überlagerung durch andere Zelle)

Effekte von Ketamin auf die leukozytäre  $\text{TNF}\alpha$ -Expression nach Stimulation mit Endotoxin (LPS)

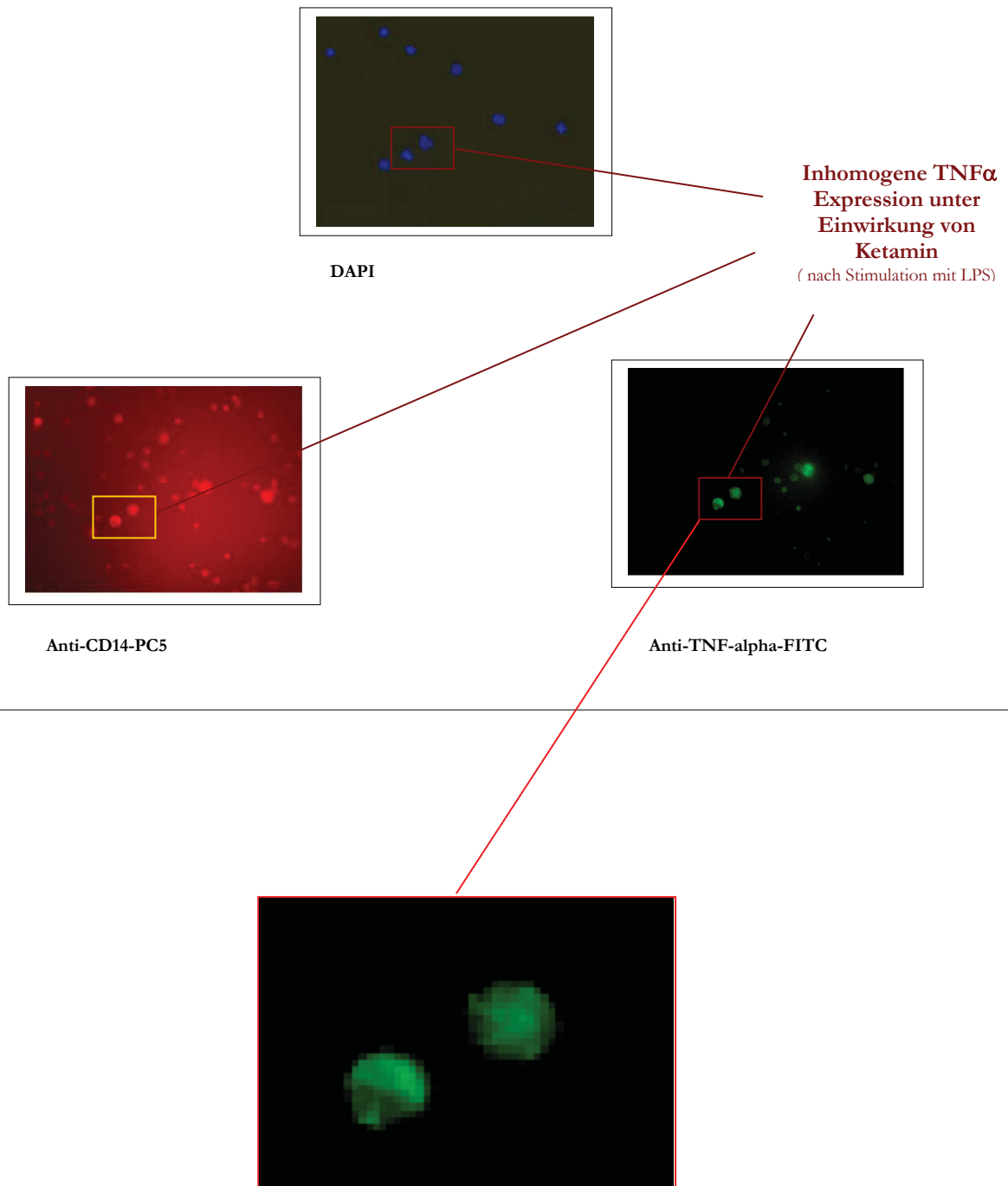


Abb 28: Effekte von Ketamin auf die leukozytäre  $\text{TNF}\alpha$ -Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie nach Färbung mit DAPI, Anti-TNF-alpha-FITC und Anti-CD14-PC5

Vergrößerungsausschnitt zeigt eine inhomogene Färbung von Monozyten

### 4.3 Effekte intravenöser Anästhetika auf die Apoptose gemessen am Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche

In einer weiteren Untersuchung mit dem Oberflächenmarker Phosphatidylserin (PS) wurde geprüft inwieweit Apoptose in der Modulation der Immunantwort durch spezifische Anästhetika eine Rolle spielt.

Durch Markierung von Zellen mit Annexin V, das an PS bindet, können anhand durchflusszytometrischer Analysen apoptotische Zellen identifiziert werden. Die Präparation der Zellen erfolgt zunächst analog zu der FACS-Aufbereitung. Die Fixierung der Zellen im Medium erfolgte in dieser Untersuchung jedoch mit Paraformaldehyd, die Färbung mit Anti-CD14-RPE und Annexin-V-FITC Antikörper.

Eine Inkubation der präparierten Zellkultur mit Annexin-V-FITC zur Identifizierung apoptotischer Zellen zeigte in unserem Modell unter klinisch gebräuchlichen Konzentrationen von Propofol und Ketamin nur geringfügige Effekte. Auch nach Verwendung pharmakologischer Dosen dieser Anästhetika blieb die Abweichung zur Negativkontrolle innerhalb von maximal 10%. Auch eine zusätzliche Stimulation mit bakteriellem Antigen zeigte keinen wesentlichen Einfluss auf die Apoptoserate (Tab. 4).

Apoptosemessung mittels Annexin V in Granulozyten und Monozyten bei gesunden Probanden																		
	neg. Kontrolle			Lipofundin			Ketamin 1x			Ketamin 10x			Propofol 1x			Propofol 10x		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Granulozyten	1,03	1,94	0,88	0,22	4,21	1,42	1,13	3,18	1,16	0,47	1,79	0,89	1,8	0,68	0,58	1,11	9,06	2,04
Monozyten	0,93	5,77	1,2	1,14	2,96	4,46	9,67	6,49	7,52	11,08	4,41	8,02	5,78	2,85	1,41	2,35	2,43	4,7

**Tab.4:** Prozentualer Anteil apoptotischer Zellen unter dem Einfluss von Ketamin und Propofol in klinischer sowie pharmakologischer Konzentrierung. Die induzierte Apoptose in Monozyten und Granulozyten nach Applikation klinischer bzw. pharmakologischer Konzentrationen von Propofol und Ketamin blieb im physiologischen Bereich. Auch eine zusätzliche Stimulation mit bakteriellem Antigen zeigte keinen wesentlichen Einfluss auf die Apoptoserate.

## 5. Diskussion

### 5.1 Modelle und Methodik

#### 5.1.1 Diskussion der Methodik

Leukozyten als Schlüsselzellen im angeborenen und adaptiven Immunsystem, werden in der vorliegenden Studie isoliert in ihren einzelnen Subpopulationen betrachtet. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Zytokinantwort nach Einfluss gebräuchlicher Anästhetika, wie Propofol und Ketamin, gelegt. Zelltypische Modulationen der Zytokinliberation konnten in verschiedenen Ansätzen nach Lyse der Erythrozyten bestimmt werden.

Mittels Fluoreszenzzytometrie wurde die TNF $\alpha$  Expression am Endoplasmatischen Retikulum der Leukozyten quantifiziert. Um die einzelnen Subpopulationen isoliert darstellen zu können, wurden die Monozyten mit ihrem spezifischen Oberflächenmarker CD14 markiert. Somit war die Identifikation von Granulozyten ebenfalls gewährleistet. Lymphozyten wurden durch charakteristische Aktivierungsmarker CD69, CD4 sowie CD8 subsummiert. Diese Untersuchung basiert auf einem validierten Protokoll der Firma BD für intrazelluläre Zytokinfärbung.

Vorteil der FACS-Analyse gegenüber den Alternativen Western Plot und RT-PCR liegt in der Vermeidung von Isolationsfaktoren. Die Leukozyten wurden aus dem Vollblutansatz isoliert und anschließend schonend mit entsprechenden fluoreszierenden Antikörpern inkubiert. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fluoreszenz-Antikörper TNF-FITC und CD14-RPE sind in der durchflusszytometrischen Analyse allgemein etabliert. Zusätzlich wurden zur Charakterisierung der zelltypspezifischen Modulationen der Zytokinantwort in diesem Ansatz nach Lyse der Erythrozyten die intrazelluläre Bildung von TNF $\alpha$  durch die Fluoreszenzzytometrie gemessen. Dabei konnte auf validierte Standardprotokolle aus der Routinediagnostik zurückgegriffen werden. Durch Festlegung einer bestimmten Anzahl gemessener Ereignisse pro Zeiteinheit, sollte eine gewisse Standardisierung erreicht werden. Nachteil dieses Untersuchungsverfahrens ist die mögliche Darstellung von Artefakten oder Eigenfluoreszenzen, welche schwer voneinander abzugrenzen sind.

Zur Ergänzung, sowie qualitativen Bekräftigung der Resultate am FACS stellten wir die Zytokinantwort, vordergründig von Monozyten und Granulozyten, nach Stimulation und unter Einwirkung der spezifischen Anästhetika mittels Fluoreszenzmikroskopie dar. Die Problematik dieser Untersuchung liegt darin, dass trotz einheitlicher Belichtungszeiten Überbelichtungsartefakte entstanden sind, welche durch die Software nicht kompensiert werden konnten. Kritisch müssen deshalb die quantitativen Aussagen, wie Steigerung bzw. Suppression der Zytokinexpression, betrachtet werden. Jedoch überzeugt die Methode durch eine sehr hohe Spezifität. Vorteilhaft bei diesem spezifischen Verfahren ist die differenzierte Darstellung der einzelnen Subpopulationen der

Leukozyten mittels DAPI, welche eine Beurteilung der entsprechenden Zellen anhand der Kernmorphologie ermöglicht.

Die Untersuchung der spezifischen Modulation durch die Anästhetika Propofol und Ketamin ließ hier immer noch Diskrepanzen im Vergleich zu den Experimenten am Fluoreszenzzytometer zu, weshalb auf diesem Gebiet noch Untersuchungen folgen müssen.

Änderungen der Osmolalität und pH-Wert Schwankungen konnten in unseren Untersuchungen vernachlässigt werden, da diese bereits in Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe von HOFF ET AL. (Hoff et al., 2003) keinen relevanten Einfluss auf die Untersuchungsansätze zeigten. Diese Arbeitsgruppe publizierte außerdem, dass keine bedeutsamen Veränderungen in der Expression des Major-Histokompatibilitätskomplex-Klasse II-Moleküls (HLA-DR) zu verzeichnen waren. Die Expressionsdichte des Endotoxin erkennenden Oberflächenrezeptors CD14 wurde jedoch laut HOFF ET AL. wesentlich durch die Zugabe von Anästhetika gesteigert. Schon unter klinischen Konzentrationen kam es zur Verschiebung der beiden Phänotypen des CD14 Rezeptors. Der CD14+-Phänotyp, der mit einer geringen Expressionsdichte vergesellschaftet ist, steht dem CD14++-Phänotyp, der mit einer hohen Expressionsdichte des Rezeptors einhergeht, gegenüber. Bei diesen Betrachtungen zeigten Ketamin und Propofol adversative Effekte, wobei Ketamin in pharmakologischer Dosierung und unter LPS-Stimulation den Anteil des CD14+-Phänotyps senkte. Äquivalent dazu zeigte Propofol in zehnfacher Konzentrierung nach Endotoxin Stimulation eine signifikante Abnahme des CD14++-Phänotyps (Bauer et al., 1998; Hoff et al., 2003). Aufgrund der Voruntersuchungen von HOFF ET AL. konnten wir diese Aspekte vernachlässigen und in Ergänzung und Aufbau dieser Arbeit vor allem die direkte gerichtete Modulation von Ketamin und Propofol auf alle Subpopulationen der Leukozyten nach bakterieller Stimulation betrachten

Um eine schonende Präparation der Blutkultur beweisen zu können, wurde ein Zusatzexperiment angeschlossen. Mittels Phosphatidylserin, einem Apoptosemarker, sollte gezeigt werden, dass keine frühzeitigen Zelluntergänge durch die Aufbereitung der Zelllinien zu verzeichnen sind. Auch durch zusätzliche Applikation von Propofol und Ketamin kann gezeigt werden, dass diese Anästhetika nicht in erster Linie eine apoptotische Wirkung auf die verschiedenen Zellpopulationen zeigen. Eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose wäre allerdings nur durch eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid möglich. BOYA ET AL. konnten in einer wissenschaftlichen Studie 2003 oxidativen Stress und lysosomotrope Antibiotika wie Ciprofloxacin und Norfloxacin als Auslöser des lysosomale Membran-Permeabilisierung (LMP) innerhalb der Apoptose identifizieren. In ihren Untersuchungen waren diese Gyrasehemmer in der Lage den programmierten Zelltod, Nekrose-ähnlichen Zelluntergang aber auch Apoptose ähnliche Modalitäten zu induzieren (Boya et al., 2003). Ob neben diesen Antibiotika auch andere Wirkstoffgruppen (wie Anästhetika) fähig sind lysosomale Alteration zu bedingen, welche Zelluntergang zur Folge haben können, steht weiteren intensiveren

Untersuchungen offen. Der programmierte Zelltod dient vordergründig der Aufrechterhaltung der Homöostase im Organismus. Andererseits kann im septischen Geschehen ein progredienter/inadäquater Verlust vitaler Zellen über mitochondriale Dysfunktion und Induktion einer Zytokinantwort eine Organdestruktion intensivieren (Cobb et al., 2000; Paxian et al., 2003). Das Ausmaß der induzierten Organschäden durch Apoptose und andere Modalitäten könnte jedoch von großer Bedeutung für Patienten mit bereits bestehender Organdysfunktion sein.

### 5.1.2 verwendete Modelle

Die vorliegende Untersuchung erörtert die Modulation der Immunfunktion von Leukozyten unter dem Einfluss der intravenösen Anästhetika Propofol und Ketamin im kultivierten humanen Vollblutansatz. Durch die Verwendung von Vollblut als physiologisches Medium kann auf physikalische Trennverfahren, wie sie bei der Isolierung von Zellen über Dichte-Gradienten notwendig sind, verzichtet werden. In einer Versuchsreihe über die Stimulationsergebnisse verschiedener Zytokine konnte gezeigt werden, dass Vollblutkulturen für derartige Analysen am besten geeignet sind, insbesondere im Hinblick auf die LPS-stimulierte TNF $\alpha$ -Expression (De Groote et al., 1992; Bauer et al., 1997). Da die Zellen sich weiterhin in einem physiologischen Milieu befinden und sich das Verhältnis der verschiedenen Blutzellen untereinander nicht verändert, bleiben gegenseitige Regulationsmechanismen weitgehend erhalten. Eine Beeinflussung der immunmodulatorischen Effekte der Anästhetika durch chirurgisches Trauma oder durch die perioperative Stressantwort wird vermieden. Jedoch können die Zellen durch die Applikation von Stresshormonen oder Patientenplasma stimuliert werden (Grundmann et al., 2000).

In einer anderen Untersuchung zeigte sich, dass die Anwesenheit von Serum einen wesentlichen Cofaktor für die stimulierbare Zytokinantwort darstellt, da etwa die TNF $\alpha$ -Antwort bei entsprechenden Untersuchungen ohne Serum wesentlich niedriger ausfiel als mit Serum (Kreutz et al., 1997). Erklärend hierfür ist die Tatsache, dass sich im Plasma physiologischerweise die höchste Konzentration an Zytokinen befindet. Aktivierungsphänomene, die bei Zellisolationen auftreten, können jedoch unterbunden werden (Haskill et al., 1988; De Groote et al., 1992; White Owen et al., 1992). So kann die Isolierung insbesondere von neutrophilen Granulozyten *in vitro*-Veränderungen der Oberflächenstrukturen sowie der granulozytären Stoffwechselfunktionen triggern (Haslett et al., 1985). Bedeutender Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch, dass Zell-Zell-Interaktionen mit der Gefäßwand nicht berücksichtigt werden können, welche beispielsweise die Zytokinproduktion und Expression von Oberflächenrezeptoren maßgeblich regulieren.

Um eine messbare Zytokinexpression zu erhalten, benötigen immunkompetente Zellen einen adäquaten Stimulus. Nichtinfektiöse Stimuli resultieren in einer Minderperfusion der Organsysteme, wie beispielsweise im Rahmen einer Operation oder eines Traumas. Als infektiöse Stimuli

imponieren Bakterien, Viren, Pilze sowie Protozoen. Die unter dem Einfluss der Erreger und ihrer Toxine einsetzende Zytokinexpression ist maßgeblich an der Initiierung der systemischen Entzündungsantwort sowie der Akutphasenreaktion beteiligt, die dem septischen Krankheitsbild zu Grunde liegen. Zur Stimulation der Zytokinantwort dienten in der vorliegenden Arbeit als gramnegativer Stimulus das Lipopolysaccharid aus *Escherichia coli* (O111:B4) sowie fMLP als spezifischer Reiz für Granulozyten. Die Stimulation der Lymphozyten erfolgte mit Staphylokokken Superantigen (SEB). Problematisch bei der LPS-Präparationen ist eine mögliche Kontamination mit anderen Bakterienprodukten (Redl et al., 2001). So konnte in einer Studie zur Signaltransduktion bei „Toll-like“-Rezeptoren (TLR) gezeigt werden, dass eine Purifikation von LPS erforderlich war, um eine Kreuzreaktion mit einem für grampositive Bakterienbestandteile verantwortlichen Rezeptortyp (TLR2) zu vermeiden (Hirschfeld et al., 2000). Diese denkbare Kontamination konnte auch in der vorliegenden Studie nicht vollständig ausgeschlossen werden, obwohl die LPS-Präparation von der höchst erhältlichen Reinheit war. Welche klinische Bedeutung Mutationen oder Modifikationen des TLR nach sich ziehen, wird derzeit ausführlich untersucht. Erste Erkenntnisse von ARBOUR ET AL. zeigten jedoch, dass in menschlichen monozytären Zelllinien unterschiedliche Gensequenzen dieses Rezeptors eine Modifikation der Immunantwort auf LPS bewirken kann (Arbour et al. 2000). Eine weitere große Studie der Arbeitsgruppe FETEROWSKI ET AL. konnte hingegen in einer klinisch experimentellen Studie an 307 kaukasischen Patienten keinen signifikanten Unterschied in der Freisetzung von Zytokinen in An- oder Abwesenheit einer Sepsis nachweisen (Feterowski et al., 2003).

Die Aufrechterhaltung der menschlichen Homöostase, als Voraussetzung einer adäquaten Immunantwort, wird durch ein fein abgestimmtes Zusammenwirken von Immunzellen, Zytokinen und neuroendokrinen Hormonen ermöglicht. Der Einfluss anästhesiologischer Interventionen auf verschiedene Ebenen der Immunabwehr wurde jahrelang in zahlreichen wissenschaftlichen Experimenten untersucht. Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen versuchten die komplexen Auswirkungen auf die körpereigene Abwehr als Folge perioperativer Immundysfunktion zu diskutieren. Inwieweit die Modifikation auf zelluläre und humorale Komponenten des Immunsystems klinische Relevanz bei der Entstehung einer Sepsis oder MOV zeigt, ist weiterhin umstritten. Da das Immun- und das zentrale Nervensystem über ein komplexes Netzwerk miteinander kommunizieren und das Gehirn die Immunaktivität mit diversen Transmittern kontrolliert, ist die differenzierte Beurteilung über direkte und indirekte Wirkungen der Anästhetika nicht strikt isoliert voneinander beurteilbar. Direkte Einflüsse von Anästhetika auf die Immunzellen lassen sich am besten in *in vitro* Studien untersuchen. Komplexe Interaktionen zwischen verschiedenen Immunkomponenten bleiben jedoch weitgehend unberücksichtigt. Auch die klinische Relevanz bei diesen Untersuchungsansätzen ist nicht eindeutig geklärt.



Die Überlagerung der anästhesiologischen Wirkungen, infolge einer Aktivierung von Immun- und Stressreaktion durch das operative Trauma, stellt ein weiteres Problem der Interpretation direkter immunologischer Effekte der Anästhetika dar.

## 5.2 Anästhesie und Immunsystem

### 5.2.1 historische Aspekte

Lange Zeit wurden wissenschaftliche Untersuchungen über den Einfluss von Anästhetika auf das Immunsystem und die Assoziation mit der Prognose des chirurgischen Patienten als praxisfern sogar als esoterisch belächelt. Heute weiß man dass der Einfluss anästhesiologischer Interventionen bedeutender ist als angenommen.

*... „neben großer Ermüdung, Erkältung, Hunger, Durst und anderen Faktoren,  
welche die rettenden Kräfte aufheben... auch die Narkose unter jene Umstände  
gebracht werden muss, welche die Immunität beseitigen“*

Dies waren erste Erkenntnisse über mögliche nachteilige Auswirkungen von Anästhetika, die 1903 in der BERLINER KLINISCHEN WOCHENSCHRIFT mit dem Titel „IMMUNITÄT UND NARKOSE“ von SNELL ET AL. publiziert wurden. Diese Arbeitsgruppe betrachtete die Effekte einer Anästhesie im Verlauf einer Milzbrandinfektion durch intratracheale Anthraxinstillation bei Meerschweinchen. Dabei zeigten sie, dass infizierte Tiere, die nach Instillation eine Chloroform- oder Äthernarkose verabreicht bekamen im Bild einer Sepsis verstarben. Wurde die Narkose allerdings vor Instillation eingeleitet, zeigten sich keine Auswirkungen. Zudem betonte bereits SNELL ET AL. eine substanzspezifische Wirkung verschiedener Anästhetika, wobei er die „bakteriziden Kräfte“ auf Alkoholderivate, nicht aber auf Opiate bezog (Snell et al., 1903). Ähnliche Ergebnisse konnten durch Äther-Chloroform-Inhalationsnarkosen an Fröschen bestätigt werden (Klei et al., 1892).

In diesen frühen tierexperimentellen Studien wurden wichtige Gesichtspunkte, wie die Vermehrung von Bakterien und deren Elimination durch das Immunsystem weitgehend vernachlässigt. Die klinische Relevanz der Ergebnisse war daher eher enttäuschend. Um die klinische Situation einer Sepsis nach chirurgischen Trauma besser simulieren zu können, wurden erst viel später anhand der Zökalligator und Punktion (*cecal ligation and puncture* - CLP) ein septischer Zustand hervorgerufen.

Postoperative Modulation der Immunantwort wurde erstmals 1899 nach Diethyl- Äther Narkose beschrieben (Chadbourn 1899). Darauf folgende tierexperimentelle Studien unter Verwendung von Halothan, Chloroform, Trichlorethylen und Barbituraten präsentierten zahlreiche toxische

Nebenwirkungen, wobei diese frühen Untersuchungen gewöhnlich in sehr hohen Konzentrationen der Medikamente durchgeführt wurde (Walton et al., 1979).

Allerdings sind erst in den letzten 25 Jahren die möglichen Einflüsse von verschiedenen Anästhetika und Anästhesieverfahren auf die Immunität und deren klinische Relevanz zunehmend in das Blickfeld wissenschaftlicher Studien gerückt. Zunächst zeigten diverse tierexperimentelle Untersuchungen, dass verschiedenste volatile und intravenöse Anästhetika einen modulierenden Effekt auf Immunfunktionen fördern. Auch direkte Effekte von Anästhetika sind bereits in den 90er Jahren beschrieben wurden. Die Arbeitsgruppe um LEDINGHAM und WATT erfassten bei polytraumatisierten Patienten, die mit Etomidat sediert wurden im Vergleich zur Benzodiazepinapplikation eine dreifach höhere Letalität (Ledingham et al., 1983). Dieser Sachverhalt konnte ein Jahr später durch KENYON ET AL. mittels tierexperimentell nachgewiesener Etomidat induzierter Suppression der Steroidhormonsynthese der Nebennierenrinde erklärt werden (Kenyon et al., 1984). Daraufhin wurde von einer kontinuierlichen Verabreichung Abstand genommen.

### 5.2.2 Einfluss unterschiedlicher Anästhesieverfahren

Es existieren verschiedene Anästhesieverfahren, welche sich durch spezifische Wirkungsweisen, Wechselwirkungen und unterschiedliche kardiovaskuläre Einflüsse auszeichnen. Zahlreiche Untersuchungen, zu den differenzierten Effekten einzelner Anästhesieverfahren wurden in den letzten Jahren unter folgendem Gesichtspunkt durchgeführt: Gibt es Anästhesieverfahren, welche durch geringe Nebenwirkungen protektiv den Krankheitsverlauf kritisch Kranker beeinflussen?

**Lokalanästhetika** zeigten dabei vordergründig supprimierende Reaktionen auf die Immunabwehr. So berichten Studien über hemmende Wirkungen von Lidocain und Bupivacain auf die Migration und die Phagozytose neutrophiler Granulozyten (Ramus et al., 1983). Außerdem wurden inhibitorische Reaktionen auf die Proliferation von Leukozyten beschrieben (Sinciair et al., 1993). Pharmakologische Konzentrationen induzierten *in vitro* nach Anwendung von Lidocain eine verminderte Synthese von Immunglobulinen. Patientinnen mit Sectio caesarea unter Epiduralanästhesie entwickelten im Vergleich zu Ihren Neugeborenen einen hemmenden Effekt auf Neutrophilen Migration und Chemotaxis (Gasparoni et al., 1998). Auch inhibitorische Wirkungen auf die Cortisolsynthese mit resultierender Reduktion der Stressantwort sind infolge Applikation von Lokalanästhetika beschrieben worden (Tonneson et al., 1988). MOORE ET AL. bestätigte durch ein Experiment aus dem Jahre 1994 einen inhibitorischen Effekt auf die IL6 Sekretion nach Applikation von Alfentanil, wodurch die hypophysäre ACTH und demzufolge die Cortisolausschüttung gedrosselt werden (Moore et al., 1994).

Untersuchungen zu **intravenösen Anästhetika** zeigen verschiedenste zelluläre Effekte *in vitro*, wenngleich derzeit immer noch kein einheitlicher Standpunkt existiert. **Sind immunologische**

**Veränderungen während eines chirurgischen Eingriffes- Resultat von Anästhesie und perioperativer Interventionen oder vordergründig durch das Trauma initiiert?** Viele Arbeitsgruppen versuchten in den letzten Jahrzehnten genau diesen Sachverhalt isoliert darzustellen. Die Übertragung experimenteller Erkenntnisse in die klinische Realität wird dadurch zusätzlich maßgeblich erschwert.

In einer Studie mit 25 Thiopental anästhesierten Patienten, zeigte eine *in vitro* Untersuchung der peripheren Blutlymphozyten vor und nach einem chirurgischen Trauma keinerlei Modifikationen der Lymphozytenproliferation und IL2 Sekretion (Correa-Sales et al., 1997). Bei zusätzlicher Stimulation der Zellpopulation mit Tetanustoxin konnte eine Abnahme in Proliferation und Freisetzung von IL2 verzeichnet werden. Unter gleichen Voraussetzungen, jedoch unter Verabreichung einer Epiduralanästhesie konnten diese Veränderungen nicht beobachtet werden (Correa-Sales et al., 1997). In einer weiteren Studie beobachteten LECRAS ET AL. nach Prostatektomie eine Steigerung des TH1/TH2 Verhältnisses nach Spinalanästhesie, während in einer Kontrollgruppe mit allgemeiner Narkose dies nicht nachgewiesen werden konnte (LeCras et al., 1998).

### **5.2.3 differenzierte Effekte auf die einzelnen Komponenten des Immunsystems**

Grundsätzlich sind Anästhetika über zwei Mechanismen in der Lage die Immunfunktion zu beeinflussen: eine direkte Wirkung auf die einzelnen Komponenten des Immunsystems sowie ein indirekter Effekt über das zentrale Nervensystem, infolge einer Modulation der *neurohumoralen Stressachse*.

#### **5.2.3.1 Neurohumorale Stressachse**

Unterschiedlichste Studien aus dem letzten Jahrzehnt, haben versucht einen Zusammenhang zwischen perioperativer Immunfunktion und endokriner Stressantwort darzulegen. Aufgrund der Komplexität des Immunsystems und der enormen Vielfalt der perioperativen Reaktionsabläufe, ist die Abgrenzung zwischen operativen, endokrinen oder anästhesiologischen Wirkungen nicht sicher möglich.

Schmerz, Angst, eindringende Mikroorganismen aber auch andere Stressfaktoren wie Hypoxie, Hypovolämie und Mediatoren aus dem Wundgebiet prägen die perioperative Immunantwort. Vordergründig resultiert über nervale Reize die Aktivierung der hypothalamisch-hypophysären-Nebennierenrinden-Achse (Weissmann et al., 1990). Hierzu zählen das sympathoadrenerge System mit den Transmittern Adrenalin und Noradrenalin, die Neurohypophyse mit dem antidiuretischen Hormon (ADH) und die Adenohypophyse mit dem adrenocorticotropen Hormon (ACTH), welches die Nebennierenrinde (NNR) zur Sezernierung von Cortisol stimuliert. Auch Thyroxin und

Trijodthyronin, die Hormone der Schilddrüse, werden in diesem System subsummiert (Adams et al., 1991).

Wie bereits einleitend beschrieben präsentiert sich diese Immunantwort, nach ADAMS ET AL., als dualer Verlauf mit beginnender akuter, aktiver Reaktion, welche durch Freisetzung von Katecholaminen und ADH die Hämodynamik des Organismus aufrechterhält. Nachfolgend wird durch Aktivierung der Adenohypophysären-NNR-Achse die subakute Wirkung eingeleitet. Im Rahmen dieser Reaktion soll eine Anpassung an die Stressreaktion infolge Freisetzung von Cortisol erzielt werden (Adams et al., 1991; Chrousos et al., 1995). Katecholamine und Glukokortikoide zeigen inhibitorische Effekte auf die Immunität. Dabei korreliert die Konzentration von Katecholaminen mit einem negativen postoperativen Outcome, wie die Entwicklung kardialer Komplikationen oder postoperativer Hypertension (Parker et al., 1995). Glukokortikoide supprimieren Reifung, Differenzierung und Proliferation aller Immunzellen, insbesondere von Makrophagen und Natürlichen Killerzellen (NK) (Sternberg et al., 2006). Zusätzlich senken sie auch die Th1/Th2 Ratio (Agarwal et al., 2001), welche in diesem Rahmen für eine Abnahme der zellvermittelten Immunantwort verantwortlich ist (Decker et al., 1996).

Anästhetika können durch Unterbindung der afferenten Impulse zum zentralen Nervensystem und durch eine Blockierung der Weiterleitung auf spinaler Ebene diesen neurohumoralen Regelkreislauf beeinflussen. Außerdem resultieren peripherere Interaktionen mit dem endokrinen System ebenso in einer Modulationen dieser Achse. Anästhetika sind in der Lage, die Stressantwort nach einem chirurgischen Trauma zu hemmen (Crozier et al., 1994; Helmy et al., 1999; Schwall et al., 2000; Marana et al., 2003) und die Abnahme der zellvermittelten Immunität zu verhindern. DESBOROUGH ET AL. konnten in einer Studie zeigen, dass Anästhetika und chirurgisches Trauma in der Lage sind den Feedback- Mechanismus zwischen ACTH und Cortisol zu modulieren. Cortisol wirkt antiinflammatorisch, supprimiert die akute IL6 Produktion, wodurch wiederum die Akkumulation von proinflammatorischen Immunzellen unterdrückt wird (Heinrich et al., 1990; Desborough et al., 2000).

Perioperativer Stress führt zusätzlich zur Aktivierung des sympathischen Systems über den Hypothalamus, wodurch Hypertonie und Tachykardien induziert werden.

Eine persistierende Aktivierung der neurohumoralen Antwort, wie sie bei inadäquater Analgosedierung vorstellbar ist, führte bereits in Tierexperimenten zu einer Beeinträchtigung der Immunkompetenz (Bauer et al., 1998). In diesen Untersuchungen konnte bereits damals gezeigt werden, dass die Aktivierung der neurohumoralen Stressachse bei Mäusen einerseits zu Infektanfälligkeit andererseits auch zur Tumorprogression beitragen kann. Untersuchungen von unterschiedlichen Arbeitsgruppen versuchten die Einflüsse auf die perioperative Immunantwort der

verschiedenen anästhesiologische Modalitäten zu differenzieren. Zusammenfassend zeigten Inhalationsanästhesien und volatile Anästhetika geringere Effekte in der Suppression der neurohumoralen Stressachse als Spinal- und Periduralanästhesien.

Unter Verwendung von Spinal- oder Epiduralanästhesien war die Modulation der neurohumoralen Stressachse nach Verletzung oder Trauma anhand einer verminderten Cortisol- und Katecholaminsekretion, sowie einer inadäquaten IL6-Antwort gekennzeichnet (Hole et al., 1982/83; Crozier et al., 1994; Schwall et al., 2000; Marana et al., 2003 ). IL6, das von TH2 Lymphozyten produziert wird, ist essentiell für den ACTH/Cortisol Stoffwechsel. Die resultierende inadäquate IL6 Sekretion reduziert somit nicht nur die neurohumorale Stressantwort, sondern führt ebenso zu einer Predominanz von TH1-Lymphozyten, gegenüber TH2-Zellen.

Kombinierte Anästhesieverfahren und volatile Anästhetika zeigten dieses Phänomen nicht (Moore et al., 1994; LeCras et al., 1998). Ähnliche Untersuchungen an Patienten nach chirurgischer Intervention unter Applikation von Propofol oder Isofluran von INADA ET AL. zeigten, dass Propofol im Vergleich zu Isofluran in der Lage ist, die Suppression der Th1/Th2 Ratio zu reduzieren (Inada et al., 2004). Somit würden die hemmenden Effekte auf die zelluläre Immunität abgeschwächt. Dies könnte in unseren Experimenten die vermehrte Liberation von TNF $\alpha$  und die Aktivierung immunkompetenter Zellen erklären. Zusätzlich waren Katecholamin- und Cortisolkonzentration unter Isofluran im Gegensatz zu Propofol deutlich erhöht. Unterschiedliche Effekte auf die Konzentration von ADH und ACTH wurden nicht beobachtet.

Aktuelle Studien bestätigen protective Effekte volatiler Anästhetika nach Ischämie oder Endotoxin getriggelter Schädigung (Reutershan et al., 2007; Hofstetter et al., 2008)

Die Arbeitsgruppe von LEDOWSKI ET AL. untersuchten erst kürzlich den Einfluss von balancierter Anästhesie (Sevoflurane/Remifentanyl) im Vergleich zur total intravenösen Anästhesie (TIVA) (Propofol/Remifentanyl) auf die neuroendokrine Stressantwort. Außerdem richteten sie ihr Augenmerk auf das Verhalten kardialer Parameter zu verschiedenen Zeitpunkten während der Narkose. Beide anästhesiologischen Regime zeigten hämodynamische Stabilität. In der neuroendokrinen Stressantwort waren unter balancierter Anästhesie höhere Plasmakonzentrationen von Katecholaminen und Cortisol zu verzeichnen. Unter TIVA zeigte sich eine abgeschwächte Stressantwort (Ledowski et al., 2005). Somit untermauerten diese Resultate die Erkenntnisse von JUCKENHOFEL ET AL. (1999) und INADA ET AL. (2004). Auch tierexperimentelle Untersuchungen an Hunden beschreiben unter extraduraler Anästhesie mit Bupivacain eine Abnahme der neurohumoralen Stressreaktion im Vergleich zur alleinigen Applikation von Morphin (Sibanda et al., 2006).

In den 80er Jahren rückte Etomidate, ein intravenöses Anästhetikum, in den Mittelpunkt verschiedener Untersuchungen. In retrospektiven Studien fiel eine Verdopplung der Mortalität von

beatmeten Intensivpatienten unter Morphin und Etomidate im Vergleich zur gebräuchlichen Analgosedierung mit Morphinen und Benzodiazepinen auf. Studien in darauffolgenden Jahren unter altem Behandlungsschema konnten die Mortalität erneut vergleichbar senken (Watt et al., 1984). Ursächlich wurde eine periphere Wirkung von Etomidate auf das neuroendokrine System angenommen. Eine Hemmung der 11 $\beta$ -Hydroxylase, einem Enzym der Cortisolbiosynthese, in der Nebennierenrinde und eine daraus resultierende NNR-Insuffizienz konnte von LONGNECKER ET AL. (1984), WAGNER ET AL. (1984a,b), DIAGO ET AL. (1988), DEN BRINKER ET AL. (2005) und BLOOMFIELD ET AL. (2006) als antiglukokorticoider Effekt nachgewiesen werden. Bereits Einzeldosen waren in der Lage dieses Enzym zu blockieren und eine relative pharmakologische NNR-Insuffizienz zu induzieren (Annane et al., 2002; Annane et al., 2005; Jones et al., 2006), wodurch narkotische Effekte bereits bei geringen Konzentrationen zu erwarten waren. Insbesondere Langzeitanwendungen in der Intensivmedizin können dramatische Auswirkungen auf die Prognose der Patienten haben (Watt et al., 1984; Jackson et al., 2005; Morris et al., 2005). In einer Studie an 60 Kindern mit Meningokokken-Sepsis, zeigte die Applikation von Etomidate eine stark beeinträchtigte adrenale Steroidsynthese unter Inhibition von 11 $\beta$ -Hydroxylase (Den Brinker et al., 2005). Auch in einer fortführenden Studie konnte dieses Phänomen der pharmakologische NNR-Elimination bestätigt werden. Supportiv benötigten diese Patientengruppen eine umfangreichere Infusions- und Vasopressorthherapie. Die Arbeitsgruppe von ANNANE ET AL. beobachtete zusätzlich, dass eine konsequente Supplementierung von Steroiden bei Verwendung von Etomidate insbesondere bei septischen Patienten einen positiven Einfluss auf das Outcome/Mortalität zeigte (Annane et al., 2005; Jones et al., 2006).

Aufgrund einer prägnanten aktuellen Relevanz dieser Themen bei schwer kranken Intensivpatienten, sind explizit Untersuchungen der Wirkmechanismen einzelner Medikamente und ihr Einfluss auf den Immunkomplex von enormer Bedeutung. Um eventuelle negative Modulationen protektiv beeinflussen zu können sind intensive Studien essentiell. Aufbauend auf erste Erkenntnisse, wie beispielsweise die adversative Wirkung von Ketamin und Propofol, kann nun ein spezieller Wirkmechanismus erörtert und anschließend klinisch umgesetzt werden.

Regionalanästhesien nehmen vordergründig postoperativ eine besondere Stellung in der Modulation der Stressantwort ein. Zahlreiche Studien postulieren, dass Regionalanästhesien, jedoch nur hohe Konzentrationen an intravenösen Opioid-Anästhetika, in der Lage sind die Stressantwort nach chirurgischen Trauma zu reduzieren (Weismann et al., 1990; Somri et al., 2002; Bozkurt et al., 2002; Burton et al., 2004; Bozkurt et al., 2004). Operative Interventionen und Gewebeverletzungen induzieren eine komplexe Aktivierung des nozizeptiven Systems. Informations- und Signalverarbeitung unterliegen hierbei einer ausgeprägten Modulation und Veränderung, wobei es zu einer erheblichen Verstärkung nozizeptiver Signale kommen kann. Aufgrund einer länger



andauernden Analgesie sind Regionalanästhetika in der Lage diese afferenten Impulse wirksam zu unterdrücken. Vergleichende Studien zwischen Regional- und Allgemeinanästhesien zeigten, dass nur hohe Dosierungen von Opiaten oder beträchtliche Konzentrationen von Inhalationsanästhetika fähig sind, die neurohumorale Immunantwort vergleichbar zu reduzieren. Anhaltende Effekte in der postoperativen Phase konnten im Vergleich zur regionalen Anästhesie nicht verzeichnet werden (Kehlet et al., 1982). In einer späteren Untersuchung konnte diese Arbeitsgruppe um KEHLET ET AL. einen besonders ausgeprägten Effekt der Periduralanästhesie bei Unterbauchoperationen beobachten. Eingriffe im Oberbauch führten hierbei nur zu einer partiellen afferenten Blockade (Kehlet et al., 1988). Diese Aussagen konnten erst kürzlich in einer Untersuchung an Kindern bekräftigt werden. Hierbei zeigte Bupivacain intra- und postoperativ eine deutliche Reduktion der Stressantwort im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Morphin (Teyin et al., 2006).

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Studien belegen, dass Opioide, wie Morphin oder Endorphine, die aus Pro-Opiomelanocortin hervorgehen, antiinflammatorische Effekte zeigen (Grimm et al., 1998). Obwohl VAN EPPS in seiner Untersuchung 1984 einen stimulierenden Effekt auf die Chemotaxis von Granulozyten nachwies (van Epps et al., 1984), konnten in späteren Studien ein inhibitorischer Effekt auf Granulozyten und Makrophagen beobachtet werden (Grimm et al., 1998). Indirekte antiinflammatorische Reaktionen leiten sie zusätzlich infolge Stimulation der neurohumoralen Stressachse mit Freisetzung von Glukokortikoiden aus der NNR ein (Mellon et al., 1999).

Auch die postoperative Anwendung von Lokalanästhetika im Rahmen von Kathetertechniken konnte ein Anstieg der Stresshormone im Blut vermindern. In einer klinischen Studie von BEILIN ET AL. boten Patienten, die postoperativ eine Patienten-kontrollierte Epiduralanästhesie erhielten, signifikant geringere Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen als das Kontrollkollektiv mit Patienten-kontrollierter Analgesie/bedarfsadaptierter Opioidgabe (Beilin et al., 2003).

Unterschiede im Verhalten der neuroendokrinen Stressreaktion spiegelten auch verschiedene Operationstechniken wider. In einer klinischen Untersuchung an Frauen mit benignen Ovarialzysten zeigte die laparoskopische Entfernung perioperativ signifikant niedrigere Stressparameter als unter Laparotomie. Auch postoperativer Schmerz war in der Versuchsgruppe nach Laparoskopie vergleichbar geringer. Somit scheint der Grad der iatrogenen intraoperativen Gewebeverletzung auch einen bedeutenden Einfluss auf die neuroendokrine Stressreaktion zu nehmen (Marana et al., 2003).

#### 5.2.3.2.1 Direkte Effekte auf Immunzellen

Direkte Effekte von Anästhetika auf die einzelnen Komponenten des Immunsystems sind vielfältigster Natur. Sie sind wahrscheinlich im Rahmen der perioperativen Gabe von Einzeldosen vernachlässigbar, während für die Langzeitanwendung zur Analgosedierung durchaus signifikante

Effekte beschrieben wurden (Eberhardt et al., 1994). Anästhetika werden in der Intensivtherapie vordergründig zur Analgosedierung eingesetzt. Aufgrund des meist schweren Krankheitsbildes auf Intensivstationen ist diese kontinuierlich über mehrere Tage notwendig. Die Bedeutung und Beeinflussung des Organismus durch Anästhetika ist dabei von besonders wichtiger Relevanz. Fortwährend versuchten verschiedenste Arbeitsgruppen diese Substanzen und ihre Wirkung auf die Immunantwort zu entschlüsseln. Auch zum jetzigen Zeitpunkt ist kein einheitlicher Standpunkt beschrieben.

Im Folgenden werden die einzelnen Subpopulationen der Leukozyten und deren Modulation durch anästhesiologische Interventionen diskutiert. Mittelpunkt unserer Untersuchungen war vor allem die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren, insbesondere von  $\text{TNF}\alpha$ .

#### *5.2.3.2.1.1 Monozyten*

Makrophagen nehmen durch ihre individuelle Fähigkeit zur Erkennung, Phagozytose, Prozessierung und Präsentation von Antigenen eine Schlüsselfunktion in der Vernetzung zwischen unspezifischen und spezifischen Immunsystem ein. Durch die Produktion von essentiellen Zytokinen (IL1, IL6, IL8,  $\text{TNF}\alpha$ , CSF) spielen sie zusätzlich eine bedeutende Rolle bei der Koordination der Immunantwort.

Experimentelle Studien von HEAGY ET AL. (Heagy et al., 2000), ALLEN ET AL. (Allen et al., 2002) und zahlreichen anderen Arbeitsgruppen (Weiss et al., 2001; Saenz et al., 2001) postulieren die intakte Funktion der Monozyten als essentiellen prognostischen Faktor bei kritisch kranken Intensivpatienten mit septischen Krankheitsbildern. LAUDANSKI ET AL. konnten in einer Untersuchung zeigen, dass eine exzessive Aktivierung von proinflammatorischen Monozyten im SIRS, eine Predominanz von Makrophagen im Blut und in peripheren Geweben, sowie die Depletion von Dendritischen Zellen die Entwicklung eines MOF günstig beeinflussen kann (Laudanski et al., 2005). Auch die Verwendung der verschiedenen Anästhetika zu Narkosezwecken zeigen spezielle Effekte auf die Funktionen der Monozyten.

Eine *in vitro* Untersuchung aus dem Jahre 1999 beschrieb bei klinisch relevanten Konzentrationen von Midazolam inhibitorische Effekte auf die Chemotaxis von Monozyten. Unter Applikation von Propofol und Fentanyl wurden jedoch keinerlei zelluläre Effekte beschrieben (Krumholz et al., 1999). Ketamin und Droperidol konnten nur durch hohe Dosen die Chemotaxis supprimieren. Die Migration der Monozyten konnte bereits bei klinischen Konzentrationen durch verschiedenste volatile, intravenöse und lokale Anästhetika beeinträchtigt werden. Der Abbau von Fremdkörpern nach Phagozytose durch Bildung reaktiver Sauerstoffradikale ist der Lyse in Granulozyten sehr ähnlich. Eine Suppression dieser Radikale konnte in klinisch relevanten Konzentration für Thiopental beschrieben werden. Unter Applikation von Propofol verzeichnete man in



pharmakologischen Dosen hemmende Effekte, jedoch wurde zusätzlich in klinischen Konzentrationen eine Suppression der Phagozytose von Monozyten beobachtet werden (Heller et al., 1998).

Erst kürzlich konnten in einer Untersuchung von CHANG ET AL. suppressive Effekte von Ketamin, in bereits klinisch relevanten Konzentrationen (100µM) auf Makrophagen beobachtet werden. Infolge einer Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials werden die Funktionen wie Phagozytose, *oxidativer burst* und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine reduziert (Chang et al., 2005). Eine Veränderung bereits der basalen Zytokinliberation konnten wir nicht zeigen, doch durch bakteriellen Stimulus konnten wir diese suppressiven Effekte der TNFα-Expression unter Ketamin bereits bei klinischen Einmalkonzentration deutlich darstellen. Inwieweit eine Modifikation innerhalb des mitochondrialen Membranpotentials eine Rolle spielt, wurde durch unsere Experimente nicht eruiert.

Besonderes Augenmerk ist neben der Beeinflussung der Chemotaxis auf die modifizierte Sekretion von Zytokinen zu richten. Hauptmediatoren der Monozyten und Makrophagen sind hierbei TNFα, IL6 und IL8. Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten eine vermehrte Sezernierung dieser Zytokine während einer Sepsis, eines Traumas oder einer Verbrennung nachweisen. In einem Experiment an Mäusen war Ketamin in der Lage die LPS-induzierte Produktion von TNFα und die Mortalität im septischen Schock zu supprimieren. Äquivalente Untersuchungen im humanen Vollblut konnten bereits bei Konzentrationen >20µg/ml eine simultane Abnahme der TNFα-Produktion nach Endotoxin Stimulation verzeichnen. Außerdem konnte eine direkte Hemmung der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere von IL6, IL8 und TNFα beobachtet werden (Kawasaki et al., 1999). Diese Erkenntnisse konnten wir für die Sekretion von TNFα in unserer experimentellen Arbeit im kultivierten humanen Vollblutansatz bestätigen. Während klinische Konzentrationen nur geringe Effekte zeigten, gestaltete sich die Suppression unter pharmakologischen Dosen signifikant.

Untersuchungen von SALMAN ET AL. beschrieben postoperativ eine gesteigerte Anfälligkeit für Infektionen durch inadäquate Phagozytose von Peritonealmakrophagen, wenn Patienten mit Thiopental narkotisiert wurden. Allerdings wurde der Alteration des Immunsystems nach chirurgischen Trauma ein bedeutender Anteil an dieser Immunparalyse zugesprochen (Saman et al., 1998).

Monozyten besitzen ebenfalls einen f-Met-Leu-Phe (fMLP) Rezeptor, der jedoch im Gegensatz zu Granulozyten eine bedeutend geringere Affinität aufzeigt (Falk et al., 1982). Dieser Rezeptor bindet an Peptide, die am N-Terminus durch formyliertes Methionin gebunden sind. Da Prokaryonten ihre gesamte Proteintranslation mit dieser Aminosäure initiieren, kann dieses als einfaches spezifisches

Signal für die Anwesenheit von Bakterien gesehen werden, wodurch Entzündungszellen, speziell Phagozyten, aktiviert werden. Auch in unseren Untersuchungen konnte man eine deutlich gerichtete Reaktion der Monozyten auf dieses Stimulans verzeichnen.

Für verschiedene Opiode konnten MENZEBACH ET AL. einen inhibitorischen Effekt auf die Expression von Komplementrezeptoren CD11b und CD35 auf der Zelloberfläche von Makrophagen nachweisen. Außerdem war eine zeit- und konzentrationsabhängige Abnahme der Phagozytosefähigkeit und des oxidativen burst in Monozyten auffällig (Menzebach et al., 2004). Fentanyl zeigte als einziges Opiat in dieser Untersuchung keine supprimierenden Alterationen. Auch die Chemotaxis von menschlichen Blutmonozyten kann unter dem Einwirken verschiedener volatiler Anästhetika beeinflusst werden. MOUDGIL ET AL. beschrieb eine signifikante Hemmung der Chemotaxis nach Applikation von Enfluran, Halothan, Methoxyfluran und N<sub>2</sub>O (Moudgil et al., 1984). Makrophagen, die koronaren Bypass-Patienten entnommen und pharmakologische Konzentrationen von Fentanyl ausgesetzt wurden, präsentierten eine sowohl verminderte als auch bedeutend langsamere Chemotaxis. Im Bereich klinisch relevanter Dosen war dieser Effekt nicht nachweisbar (Stefano et al., 1993).

Untersuchungen aus dem Jahre 2007 beobachten eine Abnahme der Produktion von proinflammatorischen Proteinen nach Anästhesie mit Sevofluran in Alveolarmakrophagen, welche anschließend durch Endotoxin ein ARDS entwickelten (Suter et al., 2007). Zusätzlich konnte YUO ET AL. protective Effekte bei Patienten mit deutlicher Schädigung der Lunge und anschließender Sevoflurananästhesie verzeichnen, welches eine entscheidende Bedeutung für kritisch kranke Patienten mit ARDS haben könnte (You et al., 2008). Erst kürzlich konnte die Arbeitsgruppe von Steurer et al., die suppressierende Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (TNF $\alpha$ ) und Chemokine aus Alveolarmakrophagen bei Endotoxinschaden unter Sevofluran untermauern, wobei eine frühzeitige Applikation von Sevofluran in den ersten 6 Stunden die deutlichsten Effekte zeigte (Steurer et al., 2009).

Viele Studien bestätigen in jahrzehntelangen Untersuchungen eine Modulation immunkompetenter Zellen, insbesondere auch der Makrophagen. Essentielle Algorithmen in der Abwehr von Antigenen werden modifiziert, wodurch ein Organismus durch zusätzlich exogen wirkende Faktoren (Stress, Medikamente, Hypoxie) in einen kritischen Zustand gebracht werden kann. Durch fehlerhafte Interaktion wird das komplexe Netzwerk gestört und somit wird opportunistischen Keimen die Invasion in den Körper erleichtert. Aus diesem Grund ist es wichtig besonders bei kritisch kranken Patienten die Immunmodulation durch verschiedene Einflussfaktoren zu entschlüsseln, um dort am richtigen Ort protektiv eingreifen zu können. Makrophagen, als Schlüsselzellen im angeborenen und adaptiven Immunsystem nehmen dabei eine zentrale Rolle ein.

#### 5.2.3.2.1.2 Granulozyten

Die bakterielle Abwehr wird maßgeblich durch die Phagozytose- und Digestionsfähigkeit neutrophiler Granulozyten repräsentiert. Obwohl diese Zellen keinerlei Spezifität für Antigene aufweisen, spielen sie zusammen mit Antikörpern und dem Komplementsystem bei der akuten Entzündung eine wichtige Rolle. Insbesondere werden diese Funktionen durch die intrazelluläre Produktion von Sauerstoffradikalen im *resiratory burst* gewährleistet. Eine Beeinflussung dieser physiologischen Prozesse durch diverse Anästhetika könnte nachteilige Auswirkungen auf das *outcome* der Patienten zeigen, da besonders bei infektgefährdeten Intensivpatienten sehr hohe Dosierungen von Anästhetika und Opioiden für eine adäquate Anxiolyse, Analgesie und Sedierung appliziert werden. Angesichts dieser Tatsache sind postoperative Infektionen, die durch anästhesiologische Interventionen begünstigt werden von besonderer klinischer Relevanz.

Zahlreiche *in vitro* Studien konnten zeigen, dass Anästhetika in der Lage sind die Leukozytenfunktion, insbesondere der Granulozyten, deutlich zu supprimieren. Dabei existieren erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Substanzklassen, aber auch innerhalb einer Gruppe waren Differenzen möglich. In einer großen Studie von HEINE ET AL. konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung von *respiratory burst*, Phagozytose und Chemotaxis neutrophiler Granulozyten nach Applikation von Propofol oder Thiopental beobachtet werden (Heine et al., 1996/97). Auch erstmalige klinische Studien konnten eine signifikante Abnahme der granulozytären Phagozytoseleistung in Abhängigkeit der Narkosedauer verzeichnen. Der prozentuale Anteil der Granulozyten, der nach Stimulation mit fMLP einen *respiratory burst* zeigte, war vier Stunden nach Propofolanästhesie signifikant reduziert im Vergleich zu einer Narkose mit Isofluran (Heine et al., 2000).

Die frühe Entzündungsreaktion zeichnet sich im wesentlichen durch *Rolling*, *Adhäsion* und *Migration* der Leukozyten aus (Ley et al., 1995). Die intermittierende Adhäsion von Leukozyten am Endothel, der Basalmembran und anderer Oberflächen ist ein essentielles Ereignis bei der Induktion einer Immunantwort. Durch Kontakt mit bestimmten Zytokinen kann die Rollbewegung der Leukozyten gestoppt werden und die Diapedese entrieren. Nach Penetration des Gewebes wirken Leukozyten destruierend auf Mikroorganismen infolge der Freisetzung von Sauerstoffradikalen, die wiederum weitere Leukozyten rekrutieren (Delano et al., 1997).

Inadäquate Interaktionen zwischen Leukozyten und dem Endothel führen sekundär infolge überproportionaler Entzündungsreaktion zu massiver Gewebszerstörung bis hin zum Multiorganversagen. Ätiologisch werden vordergründig Hämorrhagien mit nachfolgenden Ischämien verantwortlich gemacht (Childs et al., 1999/2002). Auch Anästhetika sind in der Lage diese leukozytäre Endothelfunktion zu beeinträchtigen. Volatile Anästhetika, wie Halothan und Sevoflurane aber auch Analgetika wie Fentanyl fördern das *Rolling* der Leukozyten (Morisaki et al

1997, Jansson et al., 1997). Studien zu intravenösen Narkosemitteln wie Ketamin, Propofol und Thiopental beschreiben einen hemmenden Effekt auf die Adhäsion *in vivo* (Hofbauer et al., 1998/99). Zusätzlich wurden inhibitorische Wirkungen auf die TNF $\alpha$ -induzierte Leukozytenakkumulation im Mesenterium von Ratten unter Ketamin und Thiopental beobachtet (Miller et al 1996). Propofol hingegen fungiert als Antioxidans (van der Velde et al., 1997) und steigert die Produktion antiinflammatorischer Zytokine (Gilliant et al., 1997). Diese Erkenntnisse förderten das Interesse weiterer Untersuchungen, ob Anästhetika fähig sind die proinflammatorische Immunantwort so zu drosseln, dass die massive Gewebsdestruktion nach einem hämorrhagischen Schock verhindert werden könnte. In einer Studie von ZOE ET AL. an Ratten konnte präsentiert werden, dass Ketamin während einer Hämorrhagie einen direkten inhibitorischen Effekt auf die Leukozytenadhäsion zeigt. Diese direkte Reaktion ist Folge einer Hemmung des CD11b, einem Integrin auf der Zelloberfläche von Leukozyten, das für die Adhäsion essentiell ist (Zoe et al., 2006). Ketamin könnte somit in der Lage sein, sekundären Komplikationen im hämorrhagischen Schock durch direkte Hemmung des CD11b entgegenzuwirken, was jedoch in weiteren klinischen Untersuchungen untermauert werden müsste. Propofol hingegen zeigt nur indirekte Wirkungen auf die Leukozytenfunktion (Zoe et al., 2006). Propofol induziert während eines Traumas oder einer Ischämie die Freisetzung von Stickstoffoxiden aus dem Endothel (Park et al., 1995; Mendez et al., 2003). Diese Oxide reduzieren die Expression von CD11b auf Leukozyten und senken somit das Bindungsverhalten am Endothelium (Chello et al., 1998). Auch Intralipid, die Lösungsemulsion von Propofol zeigt potente hemmende Effekte auf die Adhäsion von Leukozyten, welche auch im septischen Geschehen beschrieben wurden (Wanten et al., 2002). Interessanterweise wird diese Inhibition nicht auf die Hemmung der CD11b Expression zurückgeführt, sondern wird als gewebs- oder endothelabhängiger Effekt gedeutet (Zoe et al., 2006).

Ein Effekt auf Granulozyten nach Gabe von Anästhetika und zusätzlicher bakterieller Stimulation ist unumstritten. Jedoch zeigt nicht die Freisetzung von Zytokinen den durchbrechenden Effekt, sondern steht in den letzten Jahren in vielen Untersuchungen eine deutliche Beeinflussung des *oxidative burst* im Vordergrund der Modulation. Der Einfluss der granulozytären Phagozytoseleistung, der Freisetzung von Sauerstoffradikalen und der Chemotaxis bilden hierbei grundlegende Ansatzpunkte. Auch HOFBAUER ET AL. beobachteten, dass volatile und intravenöse Anästhetika verschiedene Funktionen von Neutrophilen beeinflussen. Dabei zeigten sich vor allem Differenzen im *oxidative burst*, in Phagozytose, Migration und Sekretion von Mediatoren (Hofbauer et al., 1999). Die Effekte der Anästhetika Propofol und Ketamin zeigten auch in unserem Experiment einen bedeutend stärkeren Einfluss der TNF $\alpha$ -Expression auf Monozyten als auf Granulozyten oder Lymphozyten. Ursache dafür könnte einerseits diese Betrachtungsweise sein, dass Granulozyten andere maßgebliche Effekte zeigen und die Expression von TNF $\alpha$  nur eine untergeordnete

Funktion in dieser Subpopulation von Leukozyten darstellt. Andererseits bilden auch Monozyten den Hauptpool für TNF $\alpha$ , weshalb ebenfalls eine geringere Reaktion trotz direkter Stimulation durch LPS und fMLP von Granulozyten zu erwarten ist. Ein weiterer zu diskutierender Faktor ist die Dauer der Inkubation. Einige Studien beschreiben, dass vor allem in Granulozyten erste geringe Effekte nach einer durchschnittlichen Inkubation von 15 Minuten zu erwarten sind. Ein maximales Schädigungsmuster jedoch erst nach 6-24h zu erwarten ist. In diesem Rahmen könnte man natürlich bei den teils geringen Effekten der Granulozyten in unserer Untersuchung eine zu geringe Einwirkungszeit diskutieren.

Durch intensivere Studien der Modifikation des *oxidative burst* könnten suffizientere Aussagen zum Verhalten von Granulozyten unter Anästhesie und perioperativen Stress getroffen werden, die klinisch auf Intensivstationen und in der weiteren Erforschung des SIRS und der Sepsis umgesetzt werden können. Wir wollten jedoch in unserer Studie einen Einfluss auf alle Leukozytenpopulation untersuchen und vergleichend einen gewissen Trend der Subpopulationen darstellen. Genau dies ist uns mittels TNF $\alpha$ -Expression gelungen, denn alle Leukozytenpopulationen zeigten einen äquivalenten Effekt unter Propofol und Ketamin. Somit kann unter diesen Bedingungen eine allgemeine Suppression unter Ketamin und eine Steigerung der Immunfunktionen unter Propofolapplikation angenommen werden.

#### 5.2.3.2.1.3 Lymphozyten

Die Reaktionen der Lymphozyten auf operativen Stress wurden bereits in vielen Studien, die sich mit perioperativen immunologischen Veränderungen beschäftigen untersucht. Potentiell existieren auf mehreren Ebenen der Regulation der zellulären und humoralen Immunantwort Angriffspunkte für Anästhetika (*neurohumorale Stressachse*). Diese Effekte sind überwiegend inhibitorischer Art. Einen hemmenden Effekt auf die lymphozytäre Proliferation zeigt beispielsweise eine Applikation von Morphin. Durch Aktivierung der Caspase 3 induziert Morphin proapoptotische Phänomene in T-Lymphozyten.

Barbiturate zeigen durch inhibitorische Effekte auf die Funktion von neutrophilen Granulozyten, monozytären Zellen, *Natural Killer Cells* sowie B- und T-Lymphozyten eine immunsuppressive Wirkung. Eine kontinuierliche Applikation von Barbituraten steht im Zusammenhang mit einer klinisch relevanten Immunsuppression. Insbesondere die Langzeitanwendung der Barbiturate bei Patienten mit einem schweren Schädel-Hirn-Trauma geht mit einer deutlich erhöhten Inzidenz nosokomialer Infektionen einher, die wiederum die Mortalität dieser Patienten beeinflussen kann (Loop et al., 2003).

Direkte Wirkungen von Anästhetika auf Lymphozyten wurden bereits im Jahre 1975 beschrieben. SLADE ET AL. publizierte eine T-Zell-Suppression, sowie eine Abnahme der T-Zell-Migration als

Antwort auf ein traumatisches Ereignis. In einer weiteren Studie an chirurgischen Intensivpatienten setzte Propofol nach *in vitro* Toxinstimulation die Lymphozytenproliferation herab, während dieser Effekt bei gesunden Probanden ausblieb (Pirttikangas et al., 1993). Dieser Sachverhalt wurde von vielen Arbeitsgruppen aufgegriffen. Im Jahre 2000 beschrieb DELOGU ET AL. dass CD4+- und CD8+-T-Zellen postoperativ eine signifikant höhere Apoptoserate aufweisen. Diese Modulation äußerte sich in einer Suppression der peripheren CD4+-T-Zellen bei gleichbleibender Anzahl von CD8+ Zellen (Delogu et al., 2000). Weiterhin induzierten Sevofluran und Isofluran dosis- und zeitabhängig *in vitro* proapoptotische Vorgänge in peripheren Lymphozyten. Da in unseren Experimenten nach Applikation von Stimulans und Anästhetikum im Vergleich zur stimulierten Basiskontrolle die Effekte deutlich geringer waren, konnte diskutiert werden, ob auch Ketamin und Propofol eine deutliche Initiierung der Apoptose dosisabhängig zur Folge haben. In einem kleinen Telexperiment zeigte sich jedoch der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen unter dem Einfluss von Ketamin und Propofol in klinischer sowie pharmakologischer Konzentrierung und unter Stimulation mit bakteriellem Antigen im Bereich von max 10%. Trotzdem müsste die in speziellen Untersuchungen erneut intensiver betrachtet werden.

Allgemein sind sowohl die Anzahl peripher zirkulierender Lymphozyten (Ogawa et al., 2000) als auch die lymphozytäre Funktion (Ogawa et al., 2000; Beilin et al., 2003) postoperativ eingeschränkt. Dabei sind alle Subpopulationen gleichermaßen involviert. Mehrfach wurden dabei eine Abnahme der CD4+-T-Lymphozyten (Bauer et al., 1998; Ogawa et al., 2000; Delogu et al., 2000) bei konstant bleibender oder zunehmenden Anzahl der CD8+-T-Lymphozyten bei perioperativen Stress beschrieben. Äquivalent kam es dabei zu einer Suppression der CD3+-Lymphozyten (Shimaoka et al., 1998; Ogawa et al., 2000). Diese Veränderungen führen wiederum zu einer Veränderung der postoperativen CD4+/CD8+-Ratio. In weiteren Studien diskutiert man einen signifikanten Abfall CD25+-Zellen (aktivierte T-Zellen)(Ogawa et al., 2000). Auch eine perioperative Umverteilung vom peripheren Blut ins lymphatische Gewebe (Toft et al., 1993) mit Abnahme der messbaren Lymphozytenzahl wurde beschrieben. Eine Umverteilung der T-Zellen in lymphatische Gewebe kann in unserer *in vitro* Studie nicht dargestellt werden und müsste auf *in vivo* Untersuchungen übertragen werden.

Interessante Untersuchungen aus dem Jahre 1994 zeigen dass Propofol in gesunden Probanden keinerlei Veränderungen auf die Lymphozytenfunktion aufweist, hingegen die Proliferation dieser Zellpopulation bei schwer Kranken inhibiert wird.

Im Gegensatz zu den zahlreichen Studien, in denen die oben genannten Phänomene charakterisiert wurden, sind die molekularen Mechanismen der immunsuppressiven Wirkungen von Anästhetika auf Lymphozyten deutlich weniger untersucht. Darüber hinaus sind auch posttranskriptionelle, translationale und posttranslationale Interferenzen mit der Expression abhängig regulierter Zielgene



von Zytokinen (z.B.  $\text{TNF}\alpha$ ), Adhäsionsmolekülen oder Wachstumsfaktoren mögliche Angriffspunkte der Anästhetika. In unseren Untersuchungen sollte explizit der Einfluss dieser Zellgruppe auf die posttranskriptionelle  $\text{TNF}\alpha$ -Expression zur Darstellung kommen. Hierbei ließen sich Tendenzen einer zielgerichteten Modulation von  $\text{TNF}\alpha$  unter Ketamin und Propofol darstellen. Einerseits sind Lymphozyten nicht die Hauptproduzenten dieses Zytokins, weshalb ein geringerer Effekt zu erwarten war. Andererseits existieren wie oben erwähnt zahlreiche Studien über Apoptoseinduktion nach Applikation von Anästhetika, welche die  $\text{TNF}\alpha$ -Liberation supprimieren würden. Diese Sachverhalte müssten in weiteren wissenschaftlichen Studien intensiver untersucht werden, denn die Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen könnte zur Vermeidung unerwünschter immunsuppressiver Wirkungen von Anästhetika beitragen. Außerdem könnten daraus neue pharmakologische Ansätze zur gezielten Immunsuppression, z.B. bei der Behandlung einer Sepsis oder im Rahmen der Organtransplantation, resultieren.

#### **5.2.4 differenzierte Effekte der untersuchten Anästhetika auf das Immunsystems**

Die beiden adversativ wirkenden Anästhetika Propofol und Ketamin rückten für unsere Untersuchungen aufgrund ihrer grundsätzlich gegensätzlich beschriebenen Modifikationen auf Immunzellen in den Mittelpunkt. Zahlreiche vergleichende experimentelle Untersuchungen beider Anästhetika sind in den letzten Jahrzehnten an Tieren, *in vivo* und *in vitro* durchgeführt worden. Bei langzeitbeatmeten Intensivpatienten können Anästhetika einen wichtigen Einfluss auf die Immunfunktionen des Individuums nehmen und den Heilungsverlauf protektiv beziehungsweise destruktiv beeinflussen.

##### 5.2.4.1 Ketamin und perioperative Immunfunktion

In zahlreichen *in vitro* Studien (Kawasaki et al. 2001; Yu et al. 2002) sowie tierexperimentellen (Shaked et al., 2004) und klinischen Untersuchungen konnte eine suppressive Modifikation in der Reaktion immunkompetenter Zellen unter Ketamin gezeigt werden (Zilberstein et al., 2002).

YU ET AL inkubierte mononukleäre Zellen aus Rattenblut mit Ketamin sowie mit und ohne Endotoxin. Die Applikation von Ketamin reduzierte signifikant den LPS assoziierten Anstieg der  $\text{TNF}\alpha$ -Expression und der NF- $\kappa$ B-Aktivität, weshalb ein antiinflammatorischer Effekt von Ketamin zu erklären wäre. SHAKED ET AL. präsentierte erniedrigte IL6- und  $\text{TNF}\alpha$ -Serumspiegel bei Ratten mit E-coli Sepsis im Vergleich zu einer Kontrollpopulation. Auch die Mortalität in diesem Rattenkollektiv mit E-coli Sepsis war deutlich reduziert (Shaked et al., 2004). Aktuellere Studien an Ratten konnten diesen Sachverhalt untermauern (Gurfinkel et al., 2007).

Interessante Aspekte lieferte auch die Arbeitsgemeinschaft von SCHMIDT ET AL. zur Immunsuppression unter Ketaminapplikation. Tiere, die mit Ketamin narkotisiert wurden, zeigten im Vergleich zu einer Kontrolltiergruppe mit anderen Narkotika nach Bakteriämie keinerlei Anzeichen eines septischen Krankheitsbildes. Ursächlich dafür wurde von dieser Arbeitsgruppe eine signifikante Suppression der Leukozyten Adhärenz angesehen, die in der Kaskade der Sepsis eine primäre Stellung vertritt. Durch Unterbindung der Adhärenz mit anschließender Penetration der immunkompetenten Zellen ins Gewebe, kommt es folglich zur verminderten Freisetzung von Mediatoren, welche wiederum die Freisetzung von Radikalen unterbindet (Schmidt et al., 1995). In einem weiteren Tierversuch an Ratten zeigten BETTE ET AL. einen erhöhten Spiegel von basaler IL1 $\beta$ - und IL6-mRNA in der Milz der Tiere sowie eine Reduktion der Basalexpression von TNF $\alpha$ -mRNA, was als bedeutender Effekt auf den basalen Immunstatus gedeutet werden kann (Bette et al., 2004). An Schafen konnte unter Ketaminnarkose eine deutliche Abschwächung des Lymphozytenflusses durch das primäre Lymphsystem mit gleichzeitiger Prostaglandinspiegelerhöhung verzeichnet werden. Auch *in vivo* Versuche an Primaten zeigten eine Depression der zellvermittelten Zytotoxizität von Monozyten, welche eine Narkose mit Ketamin erhielten (Thomas et al., 1982).

Ausgeprägte Maldistribution von systemischen und mikrovaskulären Blutfluss konnte in einer Studie von INCE ET AL. 1999 verzeichnet werden (Ince et al., 1999). Während systemischer Entzündungsreaktionen resultiert zytokinvermittelt eine gesteigerte Aktivierung verschiedener Systeme, die durch Applikation von Ketamin unterdrückt werden. Erhöhte Mortalitätsraten nach Applikation von Ketamin im Vergleich zu einer Kontrollgruppe konnte nach *cecal ligation and puncture* an Mäusen dargelegt werden (Hansbrough et al., 1985). Auch in jüngster Vergangenheit bestätigten Experimente an Ratten diese Thesen der Modulation. YANG ET AL. postulierte beispielsweise, dass Ketamin in hohen Dosierungen, wie sie eventuell auf Intensivstationen bei dauerhafter Narkose erreicht werden könnten, ein LPS induziertes *acute respiratory distress syndrom* (ARDS) in Ratten hemmen kann (Yang et al., 2005). Hintergrund dieser Studie ist eine intensivierte Assoziation zwischen Sepsis und ARDS mit ungefähr 40% (Hudson et al., 1995). Bisher war der Einsatz von Ketamin aufgrund stimulierender kardiovaskulärer Effekte bei Sepsis und kritisch Kranken umstritten (Yli-Hankala et al., 1992). Doch die Resultate der Arbeitsgruppe YANG ET AL., mit signifikanter Suppression der LPS induzierten TNF $\alpha$ -Produktion ab einer Ketaminkonzentration von 20 $\mu$ g und eine eventuell daraus resultierende sinkende Inzidenz für ARDS und Sepsis, könnten große Fortschritte in der Intensivmedizin nach sich ziehen. Eine Analyse des Kollektivs von SHAKED ET AL. aus Israel konnten 2004 an einem Modell für gramnegative Sepsis in Ratten eine signifikante Verbesserung der Überlebenschancen bei gleichzeitiger Suppression der TNF $\alpha$ - und IL6-Expression unter Einwirkung von Ketamin darlegen (Shaked et al., 2004). Außerdem konnte



anhand von Biopsien eine Abnahme der Akkumulation von Neutrophilen im Lungengewebe der Ratten verzeichnet werden (Yang et al., 2005), die wiederum in verschiedenen Studien nachweislich protektive Auswirkungen auf Sepsis induzierte Lungengewebsschäden zeigte (Pulido et al., 1999). Auch LPS induzierte Lebergewebsschäden, welche beispielsweise durch Akkumulation von reaktiven Sauerstoffradikalen im Leberparenchym unter oxidativem Stress gefördert werden, konnten in Ratten durch Applikation von Ketamin reduziert werden (Suliburk et al., 2005). Die Übertragung dieser Erkenntnisse auf den Menschen mit positiver Effizienz für Schwerkranke müsste in weiteren Untersuchungen analysiert werden.

Ergänzend zu den tierexperimentellen Analysen versuchten eine Vielzahl von Arbeitsgruppen in verschiedensten *in vivo* und *in vitro* Studien die Erkenntnisse aus Tiermodellen auf den Menschen zu übertragen. Vorteilhafter Effekt der *in vitro* Studien ist die Darstellung direkter Wirkungen von Anästhetika, allerdings im reduzierten physiologischen Milieu. *In vivo* Untersuchungen hingegen präsentieren die Zellen im natürlichen Umfeld; dargebotene Effekte können jedoch durch endogene und exogene Faktoren bedingt sein.

KAWASAKI ET AL. zeigten in einer *in vitro* Analyse bereits 1999 eine suppressive Reaktion proinflammatorischer Zytokine (beispielsweise TNF $\alpha$ , IL6 und IL8) im humanen Vollblut unter dem Einfluss von Ketamin nach Stimulation mit Endotoxin (Kawasaki et al., 1999; Lange et al., 2006). Auch in prospektiven randomisierten klinischen Doppelblindstudien wurden antiinflammatorische Modulationen beschrieben. ROYTBAT ET AL. beobachteten an 31 Patienten mit koronarchirurgischen Eingriffen bis zu 48h postoperativ eine signifikante Suppression erhöhter IL6 Serumspiegel bereits nach Zusatz von 0,25mg/kg KG Ketamin zur Narkoseeinleitung (Roytbat et al., 1998). In einer Folgestudie 2002 postulierte diese Arbeitsgruppe an 35 koronararteriellen Bypasspatienten, unter identischen Ketamindosierungen, eine signifikante Verringerung der Produktion von Sauerstoffradikalen aus Neutrophilen (Zilberstein et al., 2002). Außerdem konnten an menschlichen Vollblutproben pharmakologische Konzentrationen von Ketamin die LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Expression deutlich hemmen. TANIGUCHI und Mitarbeiter konnten mittels *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen antiinflammatorische Effekte von Ketamin und Thiopental bestätigen. Dabei beschrieben sie, dass unter dem Einfluss von bakteriellem Endotoxin proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL1 und IL6 signifikant inhibiert werden (Taniguchi et al., 2001).

Diese Erkenntnisse aus zahlreichen Experimenten konnten wir und die Arbeitsgruppe von HOFF ET AL (2001) untermauern. Wir konnten in allen Telexperimenten von Ketamin und seinen Enantiomeren einen supprimierenden Immuneffekt auf Leukozyten bestätigen. TNF $\alpha$  als essentieller Mediator im proinflammatorischen Geschehen wurde als Reverenzwert betrachtet und verglichen. Signifikante Resultate wie sie unter pharmakologischer Konzentration beobachtet

wurden, könnten speziell auf Intensivstationen Auswirkungen zeigen, wenn durch kontinuierliche Sedierung summierende Effekte resultieren.

Dennoch gab es auch zahlreiche Untersuchungen in den letzten Jahren, welche genau diese Erkenntnisse widerlegen. Beispielsweise konnte MATSUKI ET AL. an 26079 Patienten mit Ketamin-, Propofol- und Fentanylnarkosen, trotz dreimonatiger Beobachtungszeit, keine signifikanten Modifikationen am Immunsystem nachweisen (Matsuki et al., 2002). MOLINA ET AL. zeigten sogar dass Patienten nach einem schweren Trauma unter Ketamin Analgosedierung eine deutliche Erhöhung der TNF $\alpha$  Expression in der Milz bieten (Molina et al., 2004). Auch ROSSANO ET AL. konnte eine Erhöhung der Zytokinexpression (IL4, IL6 und TNF $\alpha$ ) aus Monozyten nachweisen (Rossano et al., 1992).

Ein weiterer Aspekt, der in vielen Studien diskutiert wird ist der Zeitpunkt der Applikation von Ketamin. So hat die Gabe von Ketamin vor einer Endotoxinämie deutlich flachere TNF $\alpha$ -Spiegel teilweise mit Überlebensvorteil und zusätzlich stärker ausgeprägte Verminderungen von arterieller Hypotension und metabolischer Azidose zur Folge als die spätere Applikation (Taniguchi et al 2001; Shaked et al. 2004; Gurfinkel et al. 2007). Auch diesen Effekt haben wir versucht in unseren Untersuchungen zu nutzen, indem zunächst die Anästhetika 1h vorinkubiert wurden, bevor der Ansatz stimuliert wurde.

Auffällig war jedoch bei den zahlreichen Analysen der letzten Jahrzehnte, das die oben genannten Reaktionen von Ketamin vordergründig nur unter pharmakologischen Konzentrationen deutlich waren (Hoff et al., 2001; Kawasaki et al., 2001; Yu et al., 2001). Auch in unserer Studie zeigten klinische Konzentrierungen nur schwache Reaktionen. Erst Plasmakonzentrationen, die beim Menschen das 10fache überschreiten präsentierten signifikante Resultate. Ob aus diesen Gründen die Applikation von Ketamin nur bei langzeitbeatmeten Intensivpatienten, nach Kumulation der Substanz auf Grund von Organdysbalancen, klinische Relevanz zeigt. Jedoch gibt es auch unter diesen Gesichtspunkten Beobachtungen, die bereits bei subklinischen Konzentrationen deutliche antiinflammatorische Reaktionen zeigen (Zilberstein et al. 2002; Taniguchi 2003; Mazar et al. 2005).

Neben einer signifikanten immunsupprimierenden Wirkung ist Ketamin im Vergleich zu Propofol und diversen anderen Anästhetika in der Lage stabilisierend auf die Herz-Kreislauffunktion zu wirken. Negativ hämodynamische Effekte dieser Substanzen können die kardiovaskuläre Stabilität zusätzlich beeinträchtigen. In Form von antagonistischen Interaktionen mit dem K<sub>ATP</sub>-Kanälen und dem Stickstoff-(NO-) zyklische Guanosinmonophosphat-(cGMP-) System resultiert durch Ketamin jedoch eine Vasokonstriktion an der glatten Gefäßmuskulatur. MAP und Herzfrequenz werden angeregt. Im septischen Geschehen hingegen kommt es zu einer enormen Steigerung der Expression von NOS, wodurch eine exzessive Freisetzung von NO mit nachfolgender Vasodilatation resultiert (Schmidt et.al., 2010).

Zusätzlich wirkt Ketamin protektiv als Radikalfänger. Die Produktion von Sauerstoffradikalen in Granulozyten stellt einen wesentlichen bakteriziden Mechanismus dar. Unter pharmakologischen Ketaminkonzentrationen konnte eine deutliche Hemmung der Bildung von Radikalen in PMN verzeichnet werden (Weiss et al., 1995).

Im Hinblick auf die derzeit verfügbare Literatur stellt Ketamin somit möglicherweise eine Therapieoption für die Langzeitsedierung von systemischen Entzündungsreaktionen (SIRS) mit arterieller Hypotension dar. Jedoch kann durch die vasokonstriktorische Wirkung von Ketamin eine per se vorhandene Mikrozirkulationsstörung bei Sepsis verstärkt werden (Lange et al., 2006). Somit müssen derzeit die Vor- und Nachteile der Anwendung von Ketamin für jeden einzelnen Fall individuell definiert werden, bis einheitliche Richtlinien festgelegt werden können.

#### 5.2.4.2 Propofol und perioperative Immunkompetenz

Auch Propofol (Disoprivan) ist ein in den letzten Jahrzehnten viel untersuchtes Anästhetikum. Unzählige Arbeiten, vornehmlich im Vergleich zu anderen Anästhetika, versuchten einen modulierenden Effekt auf immunkompetente Zellen darzustellen.

Da Propofol als Lösungsmittel Intralipid enthält, ging dieses durch ein zusätzliches Experiment in die Studie ein, um einen isolierten Effekt des Hilfsstoffes zu untersuchen. Die in vorrangigen Analysen (Hoff et al., 2001) unabhängige Wirkung von Intralipid konnte von uns ebenso wiedergegeben werden. O'DONNELL ET AL. beschreibt sogar eine unterstützende Funktion auf Neutrophile (O'Donnell et al., 1992).

Vorrangig sind in zahlreichen Untersuchungen proinflammatorische Effekte bei Applikation von Propofol beschrieben worden (Larsen et al., 1998; Taniguchi et al., 2000; Gao et al., 2004). Eine Erniedrigung der IL10 Konzentration bei gleichzeitigem Anstieg von TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$ , sowie eine Abnahme von natürlichen Killerzellen und einer Veränderung des Quotienten der T-Lymphozyten zugunsten der CD4-positiven Zellen wird auch in einer Untersuchung von BRAND ET AL. beschrieben (Brand et al., 1998). Dabei wurde Vollblut von Patienten unter Propofolnarkose mit Endotoxin stimuliert.

Untersuchungen an kritisch Kranken, die mit Propofol analgosediert wurden zeigten nach 24h und 48h einen signifikanten Anstieg proinflammatorischer Zytokine (IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ ). Antiinflammatorische Zytokine wie IL2 und IL8 präsentierten sich hingegen nach diesem Zeitintervall vermindert (Helmy et al 2001). Auch GALLEY ET AL. (Galley et al., 1998) konnte diese Erkenntnisse an menschlichen polymorphkernigen Leukozyten nach Stimulation mit Endotoxin bestätigen.

ROSSANO ET AL. (Rossano et al., 1992) postulierte ebenso im Jahre 1992 einen Anstieg proinflammatorischer Zytokine nach Gabe von Propofol in menschlichen Monozyten. Weitere

Studien belegen, dass nach Verwendung von Propofol, Thiopental und Midazolam bereits bei klinischen Konzentrationen eine Beeinträchtigung der Monozyten/Makrophagen-Funktion bezüglich Chemotaxis, Phagozytose und Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen initiiert wird (Kress et al., 1989; Krumholz et al., 1995; Heller et al., 1998; Mikawa et al., 1998). Bei chirurgischen Intensivpatienten setzte Propofol nach *in vitro* Toxinstimulation die Lymphozytenproliferation herab, während dieser Effekt bei gesunden Probanden nicht zu verzeichnen war (Pirttikangas et al. 1994). In einem anderen Experiment führte die Infusionsanästhesie mit Propofol bei Patientinnen, die sich einer Brustoperation unterzogen, zu einem erhöhten Prozentsatz an T-Helferzellen (Pirttikangas et al. 1994). Dennoch gibt es Experimente, die diese Erkenntnisse widerlegen. Bereits unter klinischen Dosierungen beschreibt die Arbeitsgruppe von LARSEN ET AL., dass nach Applikation von Propofol die Expressionsdichte von CD14, die Lipopolysaccharid stimulierte TNF $\alpha$ -Expression und die Freisetzung von IL1-Rezeptor Antagonisten in Vollblutproben eher supprimierende Effekte zeigt (Larsen et al., 1998; Schneemilch et al., 2001).

Granulozyten zeigten in einer Studie mit diesem Anästhetikum sowohl signifikante Veränderungen der Aminosäureverteilung als auch eine Hemmung der O<sub>2</sub>- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Formation (Mühling et al., 2002). Propofol inhibiert die Bildung von NO durch Hemmung der iNOS. Wie bereits erläutert, kommt es im septischen Geschehen zur vermehrten pathologischen Freisetzung von NO, das die Destruktion von Organen und die vaskuläre Hypotension unterstützt. Propofol ist somit in der Lage, die Sepsis induzierte cardiovasculäre Dysfunktion durch Suppression von NO abzumildern (Huang et al., 2006). Somit könnte Propofol bei kritisch Kranken ähnlich wie Ketamin durch Interaktion im NO System hämodynamisch protektive Wirkungen vermitteln. Auch MURPHY ET AL. konnte in seiner Analyse zeigen, dass der *neutrophil respiratory burst* nach Gabe von Propofol und nach Stimulation mit fMLP deutlich reduziert wurde. Noch offensichtlicher war die Suppression in Granulozyten von Patienten mit septischem Krankheitsbild (Murphy et al. 1996). INADA und Mitarbeiter konnten an einem Rattenmodell mit induzierter abdominaler Sepsis nachweisen, dass Propofol die Wasserstoffperoxidproduktion in neutrophilen Granulozyten signifikant stärker unterdrückt als Midazolam (Inada et al. 2001).

Auch wir konnten in unserer Studie signifikante Ergebnisse der TNF $\alpha$ -Expression nach pharmakologischer Konzentration von Propofol und bakterieller Stimulation an Leukozyten zeigen. Insbesondere Monozyten zeigten am FACS eine deutliche Zunahme der *mean fluorescence* von TNF $\alpha$ . Schlussfolgernd zeigt sich eine enorme Zunahme der Freisetzung von TNF $\alpha$  am endoplasmatischen Retikulum insbesondere der aktivierten Zellen, während der Prozentsatz der neu angeregten Zellen geringer ist.

Während Propofol einerseits in der Problematik Sepsis und Langzeitanalgesedierung kontrovers diskutiert wird, rückt ein anderes interessantes Thema immer mehr in den Vordergrund. In der

Literatur wird zunehmend über ein Propofolinfusionssyndrom diskutiert, welches vorwiegend bei Kindern mit oberen Atemwegsinfekten, bei Propofolinfusion über 68h mit hohen Dosen von 5mg/kg KG/h, bei akuten neurologischen Erkrankungen und Katecholamin- oder Steroidtherapie beobachtet wurde. Als klinische Manifestation zeigt sich frühzeitig eine progressive metabolische Azidose. Folglich kommt es zur Hyperkaliämie, Rabdomyolyse, Kreatinkinaseanstieg, Rhythmusstörung bis hin zum therapierefraktären Multiorganversagen (Kang et al., 2002; Vasile et al., 2003). Der zugrunde liegende Pathomechanismus wird in einer gestörten Fettsäureoxidation vermutet. Dieser führt zu einem Anstieg von freien Fettsäuren und Malonyl-CoA mit resultierender Kardiodepression und Rabdomyolyse (Bopp et al., 2004). Dieser Sachverhalt könnte durch Instabilität im Immunsystem die Destruktion im septischen Geschehen fördern und komplizieren. Um gezieltere Aussagen treffen zu können müssen diese Zusammenhänge noch weiter erforscht werden.

Problematisch bei der Verwendung von Propofol ist jedoch die schnelle bakterielle Kontamination aufgrund der Darreichung in einer Emulsion aus Sojamilch. Weltweit demonstrierten Untersuchungen das Auftreten vermehrter postoperativer nosokomialer Infektionen bei unsachgemäßer Lagerung und Verwendung von Propofol (Jansson et al., 2006). Dass diese Erkenntnisse eine systemische Infektion oder destruierende Eigenschaften im Sinne eines Multiorganversagens triggern könnten ist vorstellbar und unterstreichen eine professionelle Handhabung von Arzneimitteln. Nicht verbrauchte Infusionen müssen aus diesen Gründen nach 12 Stunden entsorgt werden. Um Fehlerquellen wie die bakterielle Kontamination in unserer Untersuchung zu minimieren, wurden unter Beachtung dieser Richtlinien alle Anästhetika nach einmaligem Gebrauch verworfen. Außerdem erfolgte die Lagerung in entsprechend vorgesehenen Kühlschränken.

Aufgrund dieser immer noch indifferenten Ergebnisse in den verschiedensten Studien ist die endgültige Sachlage noch sehr umstritten. Es werden noch viele intensive Studien unter aktuellsten Gesichtspunkten und modernster Labortechnik folgen müssen um endgültige Aussagen über Lang- und Kurzeiteffekte von Anästhetika sicher treffen zu können und um diese klinisch protektiv für Patienten umzusetzen. Mittlerweile lassen sich Tendenzen erkennen, welche gezielte Studien ermöglicht.

### **5.2.5 Einfluss von Zytokinen auf das Immunsystem im Rahmen einer chirurgischen Intervention**

In den letzten Jahren richtete sich der Blickpunkt zunehmend auf Zytokine, um die Veränderung in der Immunfunktion nach Anästhesie und/oder chirurgischen Traumata erklären zu können. Sie

umfassen unter anderem die angeborene und spezifische Immunität, die Hämatopoese sowie die Wundheilung.

In Antwort auf Verletzung induziert der Organismus infolge der Sekretion verschiedenster Mediatoren eine spezifische Reaktionsabfolge. Sie ist in der Lage Infektion und Destruktion von Geweben zu limitieren und aktiviert äquivalent dazu Reparationsprozesse, die notwendig sind um die ursprüngliche Funktion wiederherzustellen.

Hauptproduzenten dieser Proteine sind stimulierte Leukozyten, Monozyten, aktivierte Fibroblasten und Endothelzellen (Baumann et al., 1994). Die Aktivierung dieser Zellpopulationen ist assoziiert mit der Sekretion verschiedenster inflammatorischer Mediatoren unmittelbar im Anschluss an eine Gewebsdestruktion. Dazu zählen Zytokine, Metabolite der Arachnoidonsäure, Komplementspaltprodukte, lysosymale Enzyme und freie Sauerstoffradikale. Sie vermitteln lokale wie auch systemische Effekte, infolge Interaktionen an spezifische Rezeptoren.

Die Regulation einer Vielzahl von Zytokinen, Adhäsionmolekülen und anderen Mediatoren wird auf transkriptioneller Ebene über NF $\kappa$ B reguliert. Kritisch Kranke zeigen zumeist während intensivmedizinischer Betreuung eine enorme Zunahme dieser NF $\kappa$ B-Aktivierung. Folglich resultiert eine vermehrte Sekretion von TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6, IL8 und IL10. Zudem werden auch Veränderungen in Morbidität und Mortalität von verschiedensten Forschungsgruppen unter diesem Casus beschrieben (Salo et al., 2001).

IL6 gehört zu den einflussreichsten Zytokinen während dieser Interventionen. Ausmaß und Dauer der IL6 Sekretion verhalten sich hierbei proportional zum Grad des Traumas und spiegeln die inflammatorische Antwort auf eine Verletzung wider (Salo et al., 2001).

Aufgrund der Sekretion zahlreicher Mediatoren, sind Monozyten und Makrophagen die Zellen, welche eine akute proinflammatorische Phase nach einem chirurgischen Trauma einleiten. Diese Mediatoren, insbesondere jedoch IL1 und TNF $\alpha$  zeigen differenzierte Wirkungen. Einerseits agieren sie lokal am Endothelium. TNF $\alpha$  erhöht dabei die Permeabilität am Endothel und senkt parallel dazu die endotheliale fibrinolytische Aktivität. IL1 hingegen steigert die prokoagulatorische Aktivität. Andererseits resultiert ihre systemische Wirkung in der Aktivierung sekundärer Zytokine (Baumann et al., 1994). Eines der bedeutensten Zytokine dieser zweiten Charge ist IL6. IL6 induziert die Produktion von Akut-Phase-Proteinen und fördert die Akkumulation von proinflammatorischen Zellen. Spezifische Untersuchungen verzeichneten eine Steigerung der zirkulierenden IL6 Konzentration innerhalb von 30 Minuten nach einer Hautinzision. Signifikante Werte wurden nach 2-3 Stunden gemessen. IL6 spiegelt die Existenz einer Gewebeverletzung wider (Cruickshank et al., 1990). Proportionales Verhalten von IL6 Sekretion zur Schwere des Traumas wird vermutet, da Untersuchungen bei laporoskopischen Eingriffen signifikant geringere Konzentrationen an diesem Zytokin aufzeigten (Joris et al., 1992).



Weitere Effekte sind auf der *neurohumoralen Stressachse* beschrieben wurden. *In vitro* Studien von HEINRICH ET AL. postulieren eine vermehrte Freisetzung von ACTH aus hypophysären Zellen unter dem Einfluss von IL1, IL6 und TNF $\alpha$ . Die daraus resultierende vermehrte Freisetzung von Cortisol hemmt wiederum die Produktion von IL6, erhöht aber die Bildung von Akut-Phase-Protein (Heinrich et al., 1990).

IL6 in Verbindung mit IL1 und TNF $\alpha$  zeigen inhibitorische Effekte im Glutamin- Metabolismus. Infolge dessen resultiert ein inadäquates Zellwachstum mit stetiger Wundheilungsstörung insbesondere bei kritisch kranken Patienten (Sarantos et al., 1994). Auch indirekte Einflüsse auf die Hämatopoese sind beschrieben wurden. IL6 aktiviert Blutplättchen und fördert deren Aggregation durch Modifikationen im Cyclooxygenase-Eicosanoid-Stoffwechsel. Die Einflussnahme dieses Mechanismus auf die Hyperkoagulation, die nach großen Traumata und systemischen Infektionen beschrieben wird, bewertet man aber eher als geringfügig. TNF $\alpha$  und IL1 präsentieren *in vitro* prokoagulatorische Eigenschaften, ohne Einfluss auf die Gerinnung zu zeigen. Außerdem induziert TNF $\alpha$  *tissue factor*, hemmt Thrombomodulin und wirkt inhibitorisch auf die endotheliale fibrinolytische Funktion. Generell kann man sagen, dass Zytokine eine Schlüsselrolle zwischen Koagulation und der Immunantwort eines Organismus einnehmen. Durch Modulation der Expression von Oberflächenmolekülen und mittels Stimulation zur Sekretion von verschiedenen Mediatoren, sind Zytokine fähig die Reaktionen im Organismus zu verändern. TNF $\alpha$  (Leibovitch et al., 1987) und IL6 (Nishida et al., 1992) wirken protektiv auf die Wundheilung, wobei eine übermäßige Produktion dieser Zytokine gewebsdestruktive Eigenschaften aufweisen (Sarantos et al., 1994). Im septischen Geschehen, wenn eine proinflammatorische Reaktion abläuft und unkontrolliert enorme Mengen dieser Zytokine freigesetzt werden, kann die häufige Assoziation mit einem MOV aufgrund der destruktiven Wirkung der Zytokine erklärt werden.

Als pathogenetische Faktoren der systemischen Schädigung primär nicht erkrankter Organe in der perioperativen Intensivmedizin werden heute verschiedene Mechanismen diskutiert, die in variabler Folge oder in Kombination bei kritisch Kranken nachweisbar sind.

Neben der frühen proinflammatorischen Zytokinantwort und deren Bedeutung für das MOV und Sepsis, mehren sich die Hinweise auf die parallele Induktion einer antiinflammatorische Zytokinantwort (Bone et al., 1996). Diese posttraumatische Immunsuppression im fortgeschrittenen Stadium nach chirurgischer Intervention diskutieren verschiedenste Arbeitsgruppen seit vielen Jahren. Fokus dieser antiinflammatorischen Komponente bildet eine Dysfunktion der T-Zellen durch Sekretion von PGE<sub>2</sub> aus Monozyten in der Akut-Phase. Nachfolgend resultiert eine eingeschränkte Synthese von IL2 und IFN $\gamma$  (Wood et al., 1984). Diese inadäquate Produktion von IL2 spiegelt sich bei Antigenkontakt in einer inkompletten TH-Zell-Proliferation wider. Die

verminderte Bildung von  $\text{INF}\gamma$  setzt die Fähigkeit der Antigenpräsentation von Monozyten herab. Außerdem sind diese Zytokine ausschlaggebend in der Entwicklung von TH1 Lymphozyten, welche essentielle Bedeutung in der Zell-vermittelten Immunität zeigen.  $\text{TGF}\beta$ , ein weiteres antiinflammatorisch wirkendes Zytokin unterstützt einerseits die Bildung von  $\text{PGE}_2$  in Monozyten, andererseits hemmt es die IL2 und IL4 abhängige TH-Zell Proliferation.

Prinzipiell ist das immunologische Defizit nach großen Operationen oder Traumata und eine Abnahme der zell-vermittelten Immunität von einer Modulation in der Entwicklung von TH1-Lymphozyten gekennzeichnet.

Es existieren parallel dazu auch eine Vielzahl von wissenschaftlichen Untersuchungen, in denen direkte Effekte auf die Zytokinantwort von speziellen Anästhetika beschrieben werden.

Barbiturate sind in der Lage die Zytokinsynthese zu hemmen. In einer anderen Studie konnte anhand experimenteller Untersuchungen bei Entzündungen im ZNS hemmende Effekte auf die  $\text{TNF}\alpha$  Produktion nach Thiopental-Narkose beschrieben werden. Auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  in menschlichen Gliazellen wurde durch dieses Anästhetikum unterdrückt (Ichiyama et al., 2001). Bei Untersuchungen im inkubierten humanen Vollblutansatz wurde in Anwesenheit von Thiopental oder Etomidate außerdem die Expressionsdichte von CD14, die Lipopolysaccharid stimulierte TNF-Reaktion und die Freisetzung von IL1-Rezeptorantagonisten vermindert. Gleichzeitig war jedoch eine gesteigerte IL10 Konzentration zu verzeichnen (Larsen et al 1998).

TNF, als essentielles primäres Zytokin in der akuten proinflammatorischen Phase, wurde nach Stimulation mit einem bakteriellen Antigen in der Population aller Leukozyten in unserer Arbeitsgruppe anhand seiner Expression dargestellt. Im Folgenden die aktuellste Literaturhinweise in Gegenüberstellung mit unserer Studie.

#### 5.2.5.1 Tumor Nekrose Faktor $\alpha$ ( $\text{TNF}\alpha$ )

Monozyten und Makrophagen stellen einerseits eine wesentliche Quelle der  $\text{TNF}\alpha$ -Synthese dar (White et al., 1998). Es wird von diesen eine Vielzahl von Reizen aktiviert. Als klassischer Weg wird die Stimulation durch bakterielle Endotoxine (Lipopolysaccharide) beschrieben, die beispielsweise, gebunden an Lipopolysaccharide-bindendes-Protein (LPB), Makrophagen über den CD-14-Rezeptor zur  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion anregen können (Michie et al., 1988; Tracey et al., 1986; Lowry et al., 1995). Weiterhin konnten körpereigene Mediatoren (Interleukin-1, Prostaglandine, etc.), aber auch Stresszustände wie Hypoxie, als Reiz identifiziert werden (Ghezzi et al., 1991; Ertel et al., 1995). SEEGER ET AL. und andere Autoren zeigten zudem, dass Makrophagen zunächst durch einen primären Reiz in einen angeregten Zustand, mit relativ geringer  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion, versetzt werden.



Nach einem weiteren Stimulus jedoch ein sprunghafter, teilweiser überproportionaler Anstieg resultiert (Cavaillon et al., 1992; Deitch et al., 1994). Diese Beobachtungen lassen vermuteten, dass es mehrerer Stimuli bedarf, um die volle Reaktion zu erhalten. Der klinische Verlauf intensivmedizinischer Krankheitsbilder zeigt jedoch, dass die Entwicklung von Komplikationen, insbesondere eines MODS, bei vergleichbaren Konditionen, wie Schwere des Traumas, Alter und Vorerkrankungen des Patienten, erheblichen interindividuellen Schwankungen unterliegt. Zur pathophysiologischen Erklärung dieses Phänomens dient neben individuellen Faktoren, wie Polymorphismen im TNF-Promoter (Stueber, 1996; Flach, 1999; Majetschak, 1999; Schroeder, 2000, Arcaroli et al., 2005), das „*two-hit*“-Modell der Sepsis (Livingston, 1995). Hierbei initiiert zum Beispiel die Affektion von Mikroorganismen, als erstes Stressereignis, eine Aktivierung der Immunantwort, während erst das Auftreten eines zweiten Stimulus zu einer inadäquaten Reaktion des Immunsystems und eventuell zur Entwicklung eines MODS führt. Patienten, bei denen bereits das initiale Stressereignis ein SIRS mit der Ausbildung eines MODS verursacht, zeigen als Auslöser klinisch jedoch häufig sequentielle, nacheinander auftretende Stressereignisse, wie die Entwicklung einer Pneumonie nach großen chirurgischen Eingriffen (Livingston et al., 1995). In unseren aktuellen Untersuchungen konnte die Initiierung einer enormen Freisetzung von TNF $\alpha$  nach primärer Stimulation insbesondere für Monozyten nachgewiesen werden. Sowohl im FACS-scan, wo vordergründig die mean fluorescence gesteigert wurde, als Zeichen dafür, dass vor allem die aktivierten Zellen eine enorme Liberation von TNF $\alpha$  zur Folge haben. Andererseits konnte während der Immunfluoreszenzmikroskopie diese Aktivierung durch Stimulation untermauert werden.

Andererseits sind Monozyten/Makrophagen Zielzellen der TNF $\alpha$ -Wirkung, wodurch eine Aktivierung des bakteriziden Arsenal der Zelle einschließlich der Auslösung des *respiratory burst* und der Freisetzung sekundärer Zytokine entriert wird.

In ähnlicher Weise führt TNF $\alpha$  an neutrophilen Granulozyten zur Steigerung der Phagozytosefähigkeit, zur Produktion von Sauerstoffradikalen sowie zur verstärkten Adhärenz an Endothelzellen. Außerdem aktiviert TNF $\alpha$  zusätzlich eosinophile Granulozyten, T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen, während die Proliferation von hämatopoetischen Zellen inhibiert wird.

Durch Inhibition der Synthese der Lipoprotein-Lipase und der Unterdrückung des lipogenetischen Metabolismus in Adipozyten kann TNF $\alpha$ -Kachexie verursachen und spielt eine Rolle in der Pathogenese des endotoxischen und septischen Schocks, bei Entzündungsreaktionen und chronischen Infektionen (Camussi et al., 1991; Wajant et al., 2003). Von zentrale Bedeutung ist bei Entzündungsreaktionen die Aktivierung des Arachidonsäurestoffwechsels und der Induktion von Adhäsionsmolekülen. In der Wundheilung ist die Bildung von Prostaglandinen essentiell. Eine Überexpression führt zu pathologischen Effekten, wie Kachexie bei Tumorpatienten oder Schock bei gramnegativer Sepsis. In neusten Studien wurde sogar eine Wirkung von TNF $\alpha$  auf Enterozyten

beschrieben. Durch Induktion von Apoptose in Enterozyten wird die Translokation von Bakterien aus dem Darm unterstützt und stellt somit wiederum ein Problem für die Sepsisinduktion dar. Interessant wäre natürlich, ab welcher Menge diese destruierenden Eigenschaften vom eigenen Organismus nicht mehr ausbalanciert werden können. Sicher ist, dass durch zusätzliche Manipulation wie Katheterisierung, operativer Stress und sogar die Applikation verschiedenster Medikamente eine Modulation immunkompetenter Zellen initiiert wird, welche durch zusätzliche Infektion weitreichende Effekte haben kann. In unseren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Applikation der Anästhetika, Propofol und Ketamin unter bakteriellem Stimulus in allen Leukozytenpopulationen Modifikationen auslösen kann, die im perioperativen Management von enormer Bedeutung sein können.

### 5.2.6 Anästhesie und Sepsis

Aufgrund einer konsequenten Intensivtherapie bei kritisch Kranken mit dauerhafter Sedierung und Schmerzausschaltung, sind Einflüsse bestimmter Medikamentengruppen auf den Körper und das Immunsystem von besonderer Bedeutung. Viele Gesichtspunkte lassen vermuten, dass verschiedenste Einflüsse eine Modulation des gesamten Immunsystems eines Individuum hervorruft. Ein aktuelles Thema der heutigen Zeit, welches sicher durch die Modulationen der Immunantwort beeinflusst wird, wirft eine ganz entscheidende Frage auf,

#### **SIND MEDIKAMENTE, WIE ANÄSTHETIKA IN DER LAGE, DIE NATÜRLICHE IMMUNITÄT SO ZU MODULIEREN, DASS DIE ENTWICKLUNG EINES SIRS ODER SEPSIS GÜNSTIG BEEINFLUSST WIRD?**

Angesichts der Bedeutung postoperativer Infektionen für Mortalität und Morbidität chirurgischer Patienten ist die Frage der Beeinflussung der Immunfunktion durch Anästhetika und Sedativa ebenso von enormer klinischer Bedeutung.

Erwiesen ist, dass eine ausgeprägte Modulation der Immunantwort durch chirurgisches Trauma und schweren Krankheitsverlauf induziert wird. Den relativen Beitrag, welchen die Anästhesie und Analgesie an dieser Modifikation übernehmen, ist weiterhin umstritten.

Der direkte Nachweis einer durch Analgosedierung induzierten Immunsuppression bei intensivmedizinischem Aufenthalt ist jedoch aus bereits erläuterten Interaktionen schwierig. Infolgedessen existieren nur wenige Studien, die belegen, dass bestimmte intravenöse Anästhetika und Sedativa das Risiko für postoperative Infektionen bis hin zur Entstehung eines *systemic inflammatory response syndrome* begünstigen.

In den letzten Jahren wurde unter Berücksichtigung der Wirkung der Anästhetika zunehmend auf den Einfluss im septischen Geschehen geschaut. Eine Untersuchung aus dem Jahre 1992 beobachtete eine signifikant höhere Anzahl von Pneumonien bei maschinell beatmeten Patienten mit Hirnödemen nach Applikation von hochdosierter Barbiturattherapie mit Thiopental als bei niedrigdosiertem Thiopental oder Benzodiazepinen (Eberhardt et al., 1992).

Eine weitere Studie aus dem Jahre 2005 beschreibt leberprotektive-Effekte nach LPS induzierter Leberschädigung im septischen Geschehen. Ursächlich werden Modulationen im *oxidativen burst* der Granulozyten angesehen. Ganz aktuelle Analysen zu Ketamin wurden von LANGE ET AL. 2006 veröffentlicht. Hierbei wird Ketamin nicht nur durch die Suppression proinflammatorischer Zytokine als protektives Anästhetikum diskutiert, auch pathophysiologisch resultiert ein positives Outcome für septische Patienten. Ketamin wirkt inhibitorisch auf die Freisetzung von NO (Chen et al 2005). Im septischen Geschehen kommt es zur exzessiven Freisetzung von NO. Auch die Aktivierung von  $K_{ATP}$ -Kanälen (Kawano et al. 2005), die unter Ketamin gehemmt werden führt an den Gefäßen zu einer ausgeprägten Vasodilatation mit einer kreislaurelevanten Hypotonie. Ketamin stellt somit möglicherweise eine Therapieoption für die Langzeitsedierung von systemischen Entzündungsreaktionen (SIRS) mit arterieller Hypotension dar. Jedoch sind noch weitere Untersuchungen, sowie Langzeitergebnisse notwendig um grundlegende Aussagen treffen zu können.

### 5.2.7 Immunmodulation und Sepsis

Das selbst Medikamente des alltäglichen Gebrauchs bereits bei klinischen Dosierungen Modulationen der Immunantwort zur Folge haben können, wurde ausführlich in dieser Arbeit erläutert. Welche Konsequenzen eventuell aus einer Langzeitanalgesedierung entstehen können, wenn beispielsweise noch andere Faktoren, wie Katheterisierung, schweres chirurgisches Trauma etc. an einem Organismus Einfluss nehmen, soll folgender Abschnitt kurz darlegen.

Wie bereits einleitend erläutert, unterliegen schwer kranke Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium ihres Krankheitsprozesses einer Immunsuppression. Diese Phase, die durch eine vermehrte Freisetzung von IL10 vermittelt wird, bezeichnet man als Monozyten Deaktivierung oder Immunparalyse.

IFN $\gamma$  fördert die Proliferation von TH1-Zellen (protektiv für zelluläre Immunität), hemmt die Bildung von TH2-Zellen (humorale Immunität) und steigert die Monozyten Aktivität. Eine Hemmung von IFN $\gamma$  und ein daraus resultierendes Vorherrschen einer TH2-Antwort während des septischen Geschehens wurde von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Mack et al., 1996; Ferguson et al., 1999).

#### 5.2.7.1 Monozyten

Sepsis ist assoziiert mit einer immensen Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (Cavaillon et al., 2003). In experimentellen Studien, führte die Applikation von LPS oder Bakterienantigenen zur Aktivierung einer Vielzahl von Geweben mit Freisetzung dieser Mediatoren (Giroir et al., 1992). Diese Ausschüttung wird hauptsächlich durch gewebeständige Makrophagen gewährleistet, welches in *ex vivo* Betrachtungen an Peritoneal- und Alveolarmakrophagen anhand einer TNF- Freisetzung gezeigt werden konnte (Fitting et al., 2004). In *in situ* Analysen produzierten Milzmakrophagen große Mengen von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Ge et al., 1997), Makrophagen des Knochenmarks enthielten vermehrt TNF (Schmauder- Chock et al., 1994) und Kupffer'sche Zellen waren Ursprung für Zytokine wie IL-1 und TNF $\alpha$  (Chensue et al., 1991). Während einer Sepsis, scheinen im Gegensatz dazu im Blut zirkulierende Monozyten für eine kurzlebige Zeitspanne Hauptproduzenten von Zytokinen zu sein.

Die Darbietung einer mangelhaften Antigenpräsentation resultiert ferner aus der reduzierten Oberflächenexpression von HLA-DR auf Monozyten (Lin et al., 1993, Wesche et al., 2005). Dieser veränderte Immunstatus führt infolgedessen zu einer gesteigerten Empfindlichkeit der Patienten gegenüber nosokomiale Infektionen.

Weiterhin sind immunologische Reaktionen nach traumatischen Insult bedeutend mit der Genesung dieser Patienten assoziiert. Unmittelbar nach einem mechanischen Trauma wird die Entstehung eines *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) durch frei zirkulierende Monozyten begünstigt (Laudanski et al., 2005). Es resultiert eine exzessive Freisetzung von proinflammatorischen Monozyten.

#### 5.2.7.2 Granulozyten

Neutropenie und Defekte in der Funktion von Granulozyten, charakterisiert durch eine Dysfunktion der NADPH-Oxidase, sind assoziiert mit einer Zunahme der Infektanfälligkeit eines Individuums (Rosenzweig et al., 2004). Diese Komplikationen sind jedoch eher selten auf Intensivstationen. Größere Konsequenzen ergeben sich aus einer exzessiven Aktivierung neutrophiler Granulozyten, wodurch eine Gewebeerstörung resultiert. In zwei klinischen Kohortenstudien konnte gezeigt werden, dass Neutrophile einen wesentlichen Anteil zur Pathophysiologie kritisch kranker Patienten beitragen. Hierbei boten Patienten mit akuten *respiratory distress syndrom* eine massive pulmonale Akkumulation von Granulozyten (Ware et al., 2000), mit größtem Ausmaß bei Verstorbenen (Steinberg et al., 1994). Histologisch zeigte sich zunehmend ein Bild der Fibrose mit einem soliden eingeschränkten alveolären Gasaustausch. Außerdem stellten isolierte Zellen, aus einem Kollektiv mit Sepsis-induzierter Pneumonie eine deutlich reduzierte

Apoptosefähigkeit dar, wobei diese mit der Schwere der Sepsis korrelierte (Matuate-Bello et al., 1997; Feterowski et al., 2001, Sookhai et al., 2002). Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass dieses Signal durch einen löslichen Mediator hervorgerufen wird (Wesche-Soldato et al., 2005), denn durch die Blockierung verschiedener löslicher proinflammatorischer Signale (z.B. TNF, GM-CSF...) konnte eine Normalisierung der Apoptosezeit verzeichnet werden (Mahidhara et al., 2000). Zusätzlich war die entsprechende Lebenszeit der Granulozyten von 6-10 Stunden deutlich verlängert (Taneja et al., 2004), sodass diese durch nekrotischen Zerfall die Gewebedestruktion förderten und weitere Immunzellen rekrutierten (Mahidhara et al., 2000).

Folglich scheinen eine massive Aktivierung von Granulozyten und die Verzögerung der Apoptose offensichtlich ausschlaggebend für ein schlechteres Outcome der Patienten. Therapieansätze mit dem Ziel die Aktivierung und die Akkumulation von Granulozyten zu senken und somit einer Gewebeerstörung entgegenzuwirken, konnten in tierexperimentellen Studien bestätigt werden. Die Übertragung dieser Erfolge auf septische Patienten zeigte jedoch bis jetzt noch keine überzeugenden Resultate.

#### 5.2.7.3 Lymphozyten

Lymphozyten stellen den Mittelpunkt der adaptiven Immunantwort dar. MAHIDHARA ET AL. unterbreiteten, dass eine Entgleisung in der Apoptose von Lymphozyten in Milz, Thymus und GALT kritisch kranker Patienten eine Immunsuppression hervorruft. Folglich steigt die Verwundbarkeit für Infektionen mit der Gefahr eine Sepsis mit resultierendem MOF zu triggern. Zahlreiche Arbeitsgruppen zeigten, dass durch die Zunahme der Apoptoserate in Lymphozyten (Hotchkiss et al., 1999) und den Verlust einer adäquaten Immunantwort auf Pathogene eine Reduktion der Interaktionen zwischen angeborenen und adaptiven Immunsystem resultierte, welche die Abwehr von Infektionen zusätzlich erschwerte (Mahidhara et al., 2000). Beispielsweise beobachtete XU ET AL. in einer Studie an Mäusen mit Trauma/hämorrhagischen Schock eine Zunahme der Apoptose im Thymus und einem Mangel an funktionsfähigen T-Lymphozyten mit anschließender Immunsuppression (Xu et al., 1997). In einer vergleichbaren Untersuchung an traumatisierten Patienten korrelierte ein bedeutender Anstieg der Lymphozyten Apoptose mit einem Erliegen der Patienten nach 3 Stunden im Schock (Middelton et al., 1994; Hotchkiss et al., 2001). Gewöhnlich sind Septiker lymphopenisch, wobei Gewebeproben eine selektive Depletion von B- und CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten zeigten (Hotchkiss et al., 2001).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Veränderungen und Dysfunktionen im zellulären sowie humoralen Immunsystem destruierend auf den Krankheitsverlauf Einfluss nehmen können. Ein Ungleichgewicht triggert Apoptose, reduziert das Zusammenspiel zwischen angeborener und erworbener Immunantwort und fördert somit Infektanfälligkeit und Gewebedestruktion. Versagen

körpereigene Mechanismen der Wiederherstellung der Balance- sind SIRS und Sepsis mit resultierendem Multiorganversagen schwer aufzuhalten. Adäquate medikamentöse und intensivtechnische Gegenregulationen werden derzeit noch nachhaltig erforscht.

### 5.3 Synopsis

Angesichts der Bedeutung postoperativer Infektionen für Mortalität und Morbidität chirurgischer Patienten ist die Frage der Beeinflussung der Immunfunktion durch Anästhetika und Sedativa von enormer klinischer Bedeutung. Auch das chirurgische Trauma kann nicht nur lokale Entzündungsreize initiieren, sondern ist in der Lage eine unkontrollierte systemische Aktivierung des Immunsystems und des Neuroendokrinums zu bewirken (Beal et al., 1994, Livingston et al., 1995, Bone et al., 1996, Schütt et al., 2004). In Antwort auf Verletzung induziert der Organismus infolge der Sekretion verschiedenster Mediatoren eine spezifische Reaktionsabfolge. Sie ist in der Lage Infektion und Destruktion von Geweben zu limitieren und aktiviert äquivalent dazu Reparationsprozesse, die notwendig sind um die ursprüngliche Funktion wiederherzustellen.

Zahlreiche Studien der letzten Jahre lassen vermuten, dass Störungen in diesem komplexen Geflecht des Immunsystems durch unbalancierte Immunreaktionen entweder in einem unkontrollierten Mikrobenwachstum, oder in einer generalisierten Entzündung (SIRS) mit Gewebeerstörung und Gefäßveränderungen mit Multiorganversagen münden (Zeni et al., 1997; Buchud et al., 2003). Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass eine überschießende Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen sowie eine gleichzeitige Suppression proinflammatorischer Mediatoren, explizit  $\text{TNF}\alpha$ , zur Entstehung eines MODS im Endstadium einer Sepsis führen (Doeke et al., 1997, Lin et al., 1999; Rensing et al., 2001). Übereinstimmend mit diesen Annahmen stützen verschiedene Untersuchungen diese Vermutungen, die eine verminderte Ausschüttung von  $\text{TNF}\alpha$  nach *in vitro* Stimulation mit LPS im Vollblut von Patienten mit einem schlechteren klinischen Verlauf assoziiert ist (Lin et al., 1999; Ziegenfuß et al., 1999; Heagy et al., 2000). Jedoch konnte in einer aktuellen Analyse des Kollektivs um SHAKED ET AL. aus Israel 2004 an einem Modell für gramnegative Sepsis in Ratten eine signifikante Verbesserung der Überlebenschancen bei gleichzeitiger Suppression der  $\text{TNF}\alpha$ - und IL6-Expression unter Einwirkung von Ketamin (Shaked et al., 2004) darlegen. KAWASAKI ET AL. zeigten in einer *in vitro* Analyse bereits 1999 eine suppressive Reaktion proinflammatorischer Zytokine (beispielsweise  $\text{TNF}\alpha$ , IL6 und IL8) im humanen Vollblut unter dem Einfluss von Ketamin nach Stimulation mit Endotoxin (Kawasaki et al., 1999; Lange et al., 2006). Ob die fehlende Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine die Ursache für ein besseres Outcome in diesem Zusammenhang ist, wird kontrovers diskutiert. Aus diesem Grund ist Ketamin in den letzten Jahren eingehend untersucht wurden. Negativ hämodynamische Effekte dieser



Substanz können die kardiovaskuläre Stabilität zusätzlich beeinträchtigen. Durch Hemmung der Freisetzung von NO kommt es zur Vasokonstriktion. Im septischen Geschehen hingegen kommt es zu einer enormen Steigerung der Expression von NOS, wodurch eine exzessive Freisetzung von NO mit nachfolgender Vasodilatation resultiert (Lange et al., 2006). Somit stellt Ketamin eventuell eine interessante Alternative für kritisch kranke Patienten mit arterieller Hypotension dar. Spezielle Untersuchungen der Enantiomere sollten mögliche Vorteile vor allem jedoch immunmodulatorische Besonderheiten aufdecken. Trotz der fast vollständigen Identität der beiden Moleküle sind relevante biologische Wirkunterschiede zu verzeichnen. Beispielsweise in der Rezeptoraffinität, im Arzneimittelmetabolismus-somit in pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften (Mutschler et al., 1996; Adams et al., 1997). S-(+)-Ketamin zeigt eine doppelt so starke analgetische und anästhesiologische Potenz wie das Racemat. Eine Verdreifachung dieser Wirkung wurde gegenüber dem R-(-)-Ketamin beschrieben (Way et al., 1978; White et al., 1985; Klepstad et al., 1990, Schüttler 1992, Kress et al., 1997). Auch an den  $\kappa$ - und  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren wirkt S-(+)-Ketamin etwa vierfach stärker inhibitorisch als das R-Distomer. Das R-(-)-Enantiomer aktiviert dafür intensiviert  $\delta$ -Rezeptoren, wohingegen die Affinität des S-(+)-Eutomers wesentlich geringer ist. Die Aktivierung dieser  $\delta$ -Rezeptoren ist mit dem Auftreten unangenehmer Träume, Halluzinationen und fehlenden Erinnerungsvermögen während der Aufwachphase assoziiert (Hirota et al., 1999). Unsere Arbeitsgruppe wollte vor allem die Expression von TNF $\alpha$  in allen Leukozyten nach bakteriellem Stimulus vergleichen. Immunmodulatorisch ist allen Ketaminvariationen eine deutliche Abnahme unter pharmakologischen Konzentrierungen gemeinsam. Ketamin R-(-) zeigte hierbei im Vergleich zum Racemat Ketamin eine dezent schwächere Abweichung in Reaktion auf einen bakteriellen Stimulus. Zusammenfassend verhielten sich die unterschiedlichen Variationen von Ketamin nahezu identisch, so dass aufgrund pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Eigenschaften Ketamin S-(+) und das Racemat dem R-(-)-Eutomer vorzuziehen sind.

Grundsätzlich kann formuliert werden, dass Anästhetika und verschiedenste Anästhesieverfahren über zwei Mechanismen in der Lage sind die Immunfunktion zu beeinflussen: eine direkte Wirkung auf die einzelnen Komponenten des Immunsystems sowie ein indirekter Effekt über das zentrale Nervensystem, infolge einer Modulation der *neurohumoralen Stressachse*. Die Ergebnisse unserer Arbeit bestätigen in diesem Kontext wie oben beschrieben, dass die Anästhetika Propofol und Ketamin, sowie dessen Enantiomere direkte Einflüsse auf leukozytäre Zellen haben können. Auffallend im Vergleich zu älteren Publikationen an isolierten Zelllinien, waren zu vernachlässigende Effekte auf die basale nicht stimulierte spontane Zytokinantwort. Erst nach bakterieller Stimulation zeigten die untersuchten Anästhetika Ketamin und Propofol jeweils gerichtete adversative Reaktionen insbesondere auf die Zytokinantwort. Während Propofol eher proinflammatorische Wirkungen präsentierte, zeigte Ketamin mit seinen Enantiomeren antiinflammatorische Effekte durch

Suppression von  $\text{TNF}\alpha$ . Deutlich gegensätzliche Effekte der beiden Anästhetika waren jedoch erst unter pharmakologischen Dosierungen signifikant, die allerdings auf Intensivstationen im Rahmen einer Langzeitanalgesedierung erreicht werden könnten. Fluoreszenzmikroskopisch konnte bei dieser Arbeit die qualitativ inflammatorische Aktivierbarkeit unter dem Einfluss von bakteriellem Endotoxin innerhalb der verschiedenen Leukozytenpopulation darstellt werden. Der Einfluss der Anästhetika brachte aufgrund starker Belichtungsartefakte nicht den gewünschten Effekt. Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe um HOFF ET AL. konnte weiterhin auf molekularer Ebene gegensinnige Effekte der Anästhetika auf die Transkription des  $\text{TNF}\alpha$ -Gens zeigen (Hoff et al., 2001)

Viele Ergebnisse sowohl experimenteller als auch klinischer Studien der letzten Jahre lassen vermuten, dass eine Balance zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Mediatoren für eine adäquate Immunantwort unerlässlich ist (Bone 1996). Ein Ungleichgewicht triggert Apoptose, reduziert das Zusammenspiel zwischen angeborener und erworbener Immunantwort und fördert somit Infektanfälligkeit und Gewebedestruktion. In einem kleinen Teilexperiment konnten bei unseren Untersuchungen keine frühzeitigen Zelluntergänge von Monozyten und Granulozyten vor und nach Applikation der Anästhetika verzeichnet werden. In anderen Untersuchungen von BOYA ET AL. waren Gyrasehemmer in der Lage den programmierten Zelltod, Nekrose ähnlichen Zelluntergang aber auch Apoptose ähnliche Modalitäten durch lysosomale Alteration zu induzieren (Boya et al., 2003). Da in der Literatur vor allem bei Lymphozyten die Induktion von Apoptose diskutiert wird und da zahlreiche Signalkaskaden existieren, welche eine Apoptose einleiten können sind vor allem auf diesem Teilgebiet weitere experimentelle Analysen von klinischer Bedeutung.

Ein komplexes Netzwerk aus Immunzellen, Zytokinen und neuroendokrinen Hormonen ermöglicht durch ein fein abgestimmtes Zusammenspiel die Aufrechterhaltung der menschlichen Homöostase. Vordergründig zeigt diese ausgeglichene Balance bei schwer kranken Intensivpatienten klinische Relevanz. Durch unzählige verschiedenste Angriffspunkte durch jegliche Manipulation am Organismus kommt es schnell zu Dysbalancen, welche wiederum Organdestruktion, Infektionen und schlechtes Outcome fördern. Es wird noch zahlreiche intensivierten Studien geben müssen, um ein optimales Management auf Intensivstationen zu erreichen.



## VI. Literatur und Quellverzeichnis

### A

Abraham E. (1996) **Alterations in transcription regulation of proinflammatory and immunoregulatory cytokine expression by hemorrhage, injury, and critical illness.** New Horizons 4, 184-193

Adams H. A., Schmitz C. S. Baltes- Götz B. (1994) **Endokrine Stressreaktion, Kreislauf- und Aufwachverhalten bei totaler intravenöser und Inhalationsanästhesie – Propofol versus Isofluran.** Anaesthesist 43, 730-737

Adams H. A., Thiel A., Jung A., Fengler G., Hempelmann G. (1992) **Untersuchungen mit S-(+)-Ketamin an Probanden, endokrine- und Kreislaufreaktionen, Aufwachverhalten und Traumerlebnisse.** Anaesthesist 41, 588-596

Adams H. A., Werner C. (1997) **Vom Racemate zum Eutomer: (S)- Ketamin. Renaissance einer Substanz?** Anaesthesist 46 , 1026- 1042

Aderem A., Underhill D. M. (1999) **Mechanisms of phagocytosis in macrophages.** Annu Rev Immunol 17, 593-623

Aderem A., Ulevitch R. J. (2000) **Toll- like receptors in the induction of the innate immune response.** Nature 406, 782-787

Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, et al., (2000) **NF- $\kappa$ B expression in mononuclear cells of septic patients resembles that observed in LPS-tolerance** Am J Respir Crit Care Med 2000; 162, 1877–1883

Aggarwal B.,Natarajan K. (1996) **Tumor necrosis factor: developments during the last decade.** Eur Cytokine Netw 7, 93-124

Akata T., Izumi K., Nakashima M. (2001) **Mechanisms of direct inhibitory action of ketamine on vascular smooth muscle in mesenteric resistance arteries.** Anesthesiology 95, 452-462

Albuszies G., Bruckner U. B. (2003) **Antioxidant therapy in sepsis.** Intensive Care Med 29, 1632-6.

Aliprantis A.O., Yang R.B., Mark M.R., Suggett S., Devaux B, Radolf J.D, Klimpel GR., Godowski P, Zychlinsky A. (1999) **Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2.** Science. 285, 736–739

Anname D., Sebille V., Charpentier C. et al. (2002) **Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock.** JAMA 288(7), 862-871

Anderson H. A, Maylock C. A, Williams J. A., Paweletz C. P., Shu H., Shacter E., (2003) **Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells.** Nat Immunol 4, 87–91

Angus D. C., Linde-Zwirble W. T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J., Pinsky M. R. (2001) **Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care.** Crit. Care Med. 29, 1303–1310

Arcaroli J., Fessler M.B., Abraham E. (2005) **Genetic Polymorphisms and Sepsis.** Shock 24, No. 4, 300–312

Ashkenazi A., and Dixit V.M. (1999) **Apoptosis control by death and decoy receptors.** Curr. Opin. Cell Biol. 11, 255–260

Ayala A., Evans T. A., Chaudry I. H. (1998) **Does hepatocellular injury in sepsis involve apoptosis?** J. Surg. Res. 76, 165–173

Ayala A., Lomas J. L., Grutkoski P. S., Chung C. S. (2003) **Pathological aspects of apoptosis in severe sepsis and shock?** Int. J. Biochem. Cell Biol. 35, 7–15

## B

Bahrami S., Redl H., Yao Y.M., Schlag G., (1996) **Involvement of bacteria/endotoxin translocation in the development of multiple organ failure.** Curr Top Microbiol Immunol 216, 239–258

Baker, S.J., and E.P. Reddy (1998) **Modulation of life and death by the TNF receptor Superfamily,** Oncogene 17, 3261–70

Barber A. E., Coyle S. M., Marano M. A., Fischer E., Calvano S. E., Fong Y., Moldawer L. L., Lowry S. F. (1993) **Glucocorticoid therapy alters hormonal and cytokine responses to endotoxin in man.** J Immunol 150, 1999–2006

Barkett, M., and T.D. Gilmore (1999) **Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors,** Oncogene 18, 6910–24

Bauch et al., (2004) **Chirurgie upgrade.** Springer ISBN 3-540-20007-x, 194–196

Bauer M. (1996) **Pathophysiologie der Sepsis- Aktuelle Konzepte.** Anaesthesist 45, 312–322

Bauer M., Rensing H., Ziegenfuß T. (1998) **Anästhesie und perioperative Immunkfunktion.** Anaesthesist 47, 538–556

Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J. H., Lanier L. L., Spies T. (1999) **Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA.** Science 285, 727–729

Beilin B., Shavit Y., Trabekín E. et al. (2003) **The Effects of postoperative Pain Management on Immune Response to Surgery.** Anesth Analg. 97, 822–827

Bernard G. R., Vincent J. L., Laterre P. F. et al. (2001) **Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis.** N Engl J Med 344(10), 699–709

Beyers E.M., Comfurius P., Dekkers D.W., Zwaal R.F. (1999) **Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells.** Biochim. Biophys. Acta. 1439, 317–330

- Bicknell S., Eeden S. van, Hayashi S., Hards J., English D., Hogg J. C. (1994) **A non-radioisotopic method for tracing neutrophils in vivo using 5'-bromo-2'-deoxyuridine.** Am J Respir Cell Mol Biol 10, 16-23
- Boise L. H., Thompson C. B., **ibid.** 274, 67 (1996); Osborne B. A., **Curr. Opin. Immunol.** 8, 245 (1996); Winoto A., **ibid.** 9, 365 (1997)
- Bone R. C. (1996) **Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS.** Crit Care Med 24, 1125- 1128
- Bopp C., Plachky J., Hofer S., Graf B. M., Weigand M. A. (2004), **Anästhesie und Intensivmedizin- eine Standortbestimmung.** Anästh. 53, 871- 879
- Bozkurt P. (2002) **The analgesic efficacy and neuroendocrine response in paediatric patients treated with two analgesic techniques: using morphine-epidural and patient-controlled analgesia.** Paediatr Anaesth 12, 248-254
- Bozkurt P, Kaya G, Yeker Y et al. (2004) **Effectiveness of morphine via thoracic epidural vs intravenous infusion on postthoracotomy pain and stress response in children.** Pediatr Anesth 14, 748-754
- Bowdle T. A., Radant A. D., Cowley D. S., Kharasch E. D., Strassman R. J., Roy-Byrne P. R., (1998) **Psychedelic Effects of Ketamine in Healthy Volunteers** Anesthesiology 88, 82-88
- Boxio R., Bossenmeyer-Pourie C., Vanderessey R., Douron C. und Nüße O. (2005) **The Immunostimulatory Peptide WKYMVm-NH<sub>2</sub> Activates Bone Marrow Mouse Neutrophils via Multiple Signal Transduction Pathways** Scand J Immunol. 62 (2) 140-7
- Boya P. et al. (2003) **Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion.** J. Exp. Med. 197, 1323-1334
- Brand J.M., Kirchner H., Poppe C., Schmucker P. (1998) **Zytokinfreisetzung und Verteilung mononuklearer Zellen im peripheren Blut unter dem Einfluß der Allgemeinnarkose.** Anaesthesist 47, 379-386
- Brockhaus M. Soluble (1997) **TNF receptor: what is the significance?** Intensive Care Med 23(8), 808-809
- Brodie C, Blumberg P.M. (2003) **Regulation of cell apoptosis by protein kinase Cδ.** Apoptosis 8, 19-27
- Brookes AJ (1999) **The essence of SNPs.** Gene 234, 177-186
- Brookes Zoe L.S., Reilly Charles S., Lawton Bethan K., Brown Nicola J. (2006) **Intravenous Anesthesia inhibits Leukozyte-endothelial interactions and Expression of CD11b after hemorrhage.** Shock, Vol. 25, No.5 pp. 492-499
- Brunk U. T., Dalen H., Roberg K., Hellquist H. B. (1997) **Photo-oxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts.** Free Radic. Biol. Med. 23, 616-626
- Brunk U. T., Neuzil J., Eaton J. W. (2001) **Lysosomal involvement in apoptosis.** Redox Rep. 6, 91-97

Brunk U. T., Svensson I. (1999) **Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak.** Redox Rep. 4, 3-11

Burton D, Nicholson G, Hall G. (2004) **Endocrine and metabolic response to surgery.** BJA-CEPD Reviews (DOI 10.1093/ bjaaccp/mkh040) 4, 144-147

## C

Carrico C. J., Meakins J. L., Marshall J. C., Fry D., Maier R.V. (1986) **Multiple-organ-failure syndrome.** Arch Surg 121, 196-208.

Cavaillon JM, Adib-Conquy M, (2005) **Monocytes/makrophages and sepsis,** Crit Care Med 2005 Vol.33, No. 12 (Suppl.)

Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, et al. (2003) **Cytokine cascade in sepsis,** Scand J Infect Dis 35, 535–544

Cavaillon JM, Munoz C, Fitting C, Misset B, Carlet J. (1992) **Circulating cytokines: the tip of the iceberg?** Circ Shock 38(2), 145-152

Chadbourne T. L. (1899) **Ether leukocytosis.** Philadelphia Med J 3, 390-395

Chen R. M., Chen T. L., Lin Y. L. et al. (2005) **Ketamine reduces nitric oxide biosynthesis in human umbilical vein endothelial cells by down-regulating endothelial nitric oxide synthase expression and intracellular calcium levels.** Crit Care Med 33, 1044-1049

Chensue SW, Terebuh PD, Remick DG, et al. (1991) **In vivo biologic and immunohistochemical analysis of interleukin-1 alpha, beta and tumor necrosis factor during experimental endotoxemia. Kinetics, Kupffer cell expression, and glucocorticoid effects.** Am J Pathol 138, 395-402

Chrousos GP (1995) **The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation.** New England Journal of Medicine 332, 1351-62

Chung C. S., Song G. Y., Lomas J., Simms H. H., Chaudry I. H., Ayala A. (2003) **Inhibition of Fas/Fas ligand signaling improves septic survival: differential effects on macrophage apoptotic and functional capacity.** J. Leukoc. Biol. 74, 344-351.

Chung C. S., Yang S. L., Song G. Y., Lomas J., Wang P., Simms H. H., Chaudry I. H., Ayala A. (2001) **Inhibition of Fas signaling prevents hepatic injury and improves organ blood flow.** Surgery 130, 339–345.

Cirelli R.A., Carey L.A., Fisher JK. et al. (1995) **Endotoxin infusion in anesthetized sheep is associated with intrapulmonary sequestration of leukocytes that immunohistochemically express tumor necrosis factor- $\alpha$**  J Leuk Biol 57, 820–826

Cirman T. et al. (2004) **Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis, mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins.** J. Biol. Chem. 279, 3578-3587

Cobb J. P., Buchman T. G., Karl I. E., Hotchkiss R. S. (2000) **Molecular biology of multiple organ dysfunction syndrome: injury, adaptation, and apoptosis.**

Surg Infect (Larchmt) 1(3), 207-215

Colonna M., Nakajima H., Cella M. (2000) **A family of inhibitory and activating Ig-like receptors that modulate function of lymphoid and myeloid cells.**  
Semin Immunol 12, 121-127

Correa-Sales C., Tosta C. E., Rizzo L. V. (1997) **The effects of anesthesia with thiopental on T lymphocyte responses to antigen and mitogens in vivo and in vitro.**  
Int J Immunopharmacol 192, 117-128

Cramer LP. (1999) **Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility.** Portland Press, 173-205

Crozier T. A., Muller J E., Quittkat D. et al. (1994) **Effect of anaesthesia on the cytokine responses to surgery.** Br J Anaesth 72, 280-285

Cuzzocrea S., Riley D. P., Caputi A. P., Salvemini D. (2001) **Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury.**  
Pharmacol Rev 53, 135-59.

## D

Daleke D.L., Lyles J.V. (2000). **Identification and purification of aminophospholipid flippases.**  
Biochim. Biophys. Acta. 1486, 108-127

Dawidowicz A. L., Fornal E., Mardarowicz M., Fijalkowska A. (2000) **The role of human lungs in the biotransformation of propofol.** Anesthesiology 93, 992-997

Decker D., Schöndorf M., Bidlingmaier F., Hirner A., von Ruecker A. A. (1996) **Surgical stress induces a shift in the type-1 / type-2 T-helper cell balance, suggesting downregulation of cell-mediated and up-regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma.** Surgery 119, 316-25

De Freitas I., Fernandez-Somoza M., Essenfeld-Sekler E., Cardier J. E. (2004) **Serum levels of the apoptosis-associated molecules, tumor necrosis factor-alpha/tumor necrosis factor type-1 receptor and FAS/FASL in sepsis,** Chest 125, 2238–2246

Declercq W., Denecker G., Fiers W. and Vandenabeele P. (1998) **Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor,** J Immunol. 161, 390-9

Deitch EA, Xu D, Franko L, Ayala A, Chaudry IH. (1994) **Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock.** Shock 1(2), 141-145

Delogu G., Moretti S., Antonucci A. et al. (2000) **Apoptosis and Surgical Trauma - Dysregulated Expression of Death and Survival Factors on Peripheral Lymphocytes.**  
Arch Surg. 135, 1141-1147

Devitt A. et al., (1998) **Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells.** Nature 392, 505-509

Dinarello C. A., (1997) **Proinflammatory and anti- inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock.** Chest 112, 321S-329S

Doenicke A., Angster R., Mayer M. et al. (1992) **Die Wirkung von S-(+)- Ketamin auf Katecholamine und Cortisol im Serum. Vergleich zu Ketamin-Racemat.** Anaesthesist 41, 597-603

Doenicke A., Kugler J., Mayer M., Angster R., Hoffmann P. (1992) **Ketamin-Razemat oder S-(+)- Ketamin und Midazolam. Die Einflüsse auf Vigilanz, Leistung und subjektives Befinden.** Anaesthesist. 41, 610-618

Doenicke A. W., Roizen M. F., Rau J., O'Connor M., Kugler J., Klotz U., Babl J. (1997) **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol in a new solvent.** Anesth Analg 85, 1399-1403

Donowitz L. G., Wenzel R. P. , Hoyt J. W. (1982) **High risk of hospital acquired infection in the ICU patient.** Crit Care Med 10, 335

Dorinsky P. M., Gadek J. E. (1989) **Mechanisms of multiple nonpulmonary organ failure in ARDS.** Chest 96, 885-892

Dransfield I., Stocks S. C., Haslett C. (1995) **Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis.** Blood 85, 3264–3273

Duan H., Dixit V.M. (1997) **RAIDD is a new 'death' adaptor molecule.** Nature. 385, 86-9

## E

Eberhardt K. E., Thimm B. M., Spring A., Maskos W. R. (1992) **Dose-dependent rate of nosocomial pulmonary infections in mechanically ventilated patients with brain oedema receiving barbiturate: a prospective case study.** Infection 20, 12-18

Engquist A., Brandt M. R., Fernandes A., Kehlet H. (1977) **The blocking effect of epidural analgesia on the adrenocortical and hyperglycaemic response to surgery.** Acta Anaesthesiol Scand 21, 330-335

Entschladen F, Gunzer M, Scheuffele C.M, Niggemann B, Zanker K.S. (2000) **T lymphocytes and neutrophil granulocytes differ in regulatory signaling and migratory dynamics with regard to spontaneous locomotion and chemotaxis.** Cell Immunol 199,104–14.

Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH. (1995) **Hypoxemia in the absence of blood loss or significant hypotension causes inflammatory cytokine release.** Am J Physiol. 269(1 Pt 2), R160-R166

Esmon C. T. (2004) **Crosstalk between inflammation and thrombosis.** Maturitas 47(4), 305-314

Evan G., Littellwood T. (1998) **A Matter of Life and Cell Death.** Science Vol. 281. no. 5381; 1317 - 1322



## F

Fadok V. A., Bratton D. L., Frasch S. C., Warner M. L., Henson P. M. (1998) **The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes.** Cell Death Differ 5:, 551–562

Fadok V.A., Bratton D.L., Konowal A., Freed P.W., Westcott J.Y., Henson P.M. (1998) **Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair.** J. Clin. Invest. 101, 890-898

Falk W, Harvath L, Leonard EJ. (1982) **Only the chemotactic subpopulation of human blood monocytes expresses receptors for the chemotactic peptide N-formylmethionylleucylphenylalanine.** Infect Immun. 36, 450-454

Faure E, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ, Polentarutti N, Muzio M, Arditi M. (2000) **Bacterial lipopolysaccharide activates NF- $\kappa$ B through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells: differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells.** J Biol Chem. 275, 11058–11063.

Fehrenbach E., 2005. **Flow cytometry in exercise immunology** , Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, Jahrgang 56, Nr.9

Ferguson N. R., Galley H. F., Webster N. R. (1999) **T helper cell subset ratios in patients with severe sepsis.** Intensive Care Med 25, 106-109

Ferrer R., Artigas A., Suarez D. et al. (2009) **Effectiveness of treatments for severe Sepsis: a prospective, multicenter, observational study.** Am J Respir Crit Care Med 180, 861-866

Ferri K. R., Groemer G. (2001) **Organelle- specific Initiation of cell death pathways.** Nat. Cell Biol.3, E255-E263

Feterowski C, Weihardt H, Emmanuilidis K, et al., (2001) **Immune protection against septic peritonitis in endotoxin-primed mice is related to reduced neutrophil apoptosis,** Eur J Immunol 31, 1268 –1277

Fitting C., Dhawan S, Cavaillon J.M. (2004), **Compartmentalisation of endotoxin tolerance** J Infect Dis 189, 1295–1303

Foghsgaard L. et al., (2001) **Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor.** J. Cell Biol. 153, 999-1009

Frasch S. C, Henson P. M, Kailey J. M ,Richter D. A, Janes M. S, Fadok V. A,Bratton D. L(2000) **Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta.** J Biol Chem 275, 23065-23073

Freeman B. D.,Buchman T. G. (2000) **Gene in a haystack: tumor necrosis factor polymorphisms and outcome in sepsis.**Crit Care Med 28, 3090-3091

Freudenberg M. (2005) **Die Rolle von Lipopolysaccharid im Wechselspiel zwischen Bakterien und Immunsystem.** Dissertation, Max-Planck-Institut für Immunologie, Freiburg

Frey H. H., Löscher W. (1996) **Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.** Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 139-204

## G

Gao J., Zeng B. X., Zhou L. J., Yuan S. Y. (2004) **Protective effects of early treatment with propofol on endotoxin-induced acute lung injury in rats.** Br J Anaesth 92, 277-9

Gardlund B., Sjölin J., Nilsson A., Roll M., Wickerts C. J., Wretling B. (1995) **Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlation with disease severity.** J Infect Dis 172, 296-301

Gasparoni A., De Amici D., Ciardelli L., Autelli M., Regazzi-Bonora M., Bartoli A., Chirico G., Rondini G. (1998) **Effect of lidocaine on neutrophil chemotaxis in newborn infants.** J Clin Immunol 18, 210-213

Ge Y., Ezzel RM, Clark BD, et al. (1997), **Relationship of tissue and cellular interleukin-1 and lipopolysaccharide after endotoxemia and bacteremia** J Infect Dis 176, 1313-1321

Ghezzi P., Dinarello C.A., Bianchi M., Rosandich M.E., Repine J.E., White C.W. (1991) **Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human mononuclear cells** Cytokine 3(3), 189-194

Giroir BP, Johnson JH, Brown T, et al., **The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia.** J Clin Invest 1992; 90, 693-698

Gleeson M., (2007) **Immune function in sport and exercise.** Journal of applied physiology 103, 693-699

Goode H. F., Webster N. R. (1993) **Free radicals and antioxidants in sepsis.** Crit Care Med 21, 1770-6

Green D..R (1995) **Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl,** J Exp Med 182, 1545-56

Groeneveld A. B., Sipkema P. (2000) **Interaction of oxyradicals, antioxidants, and nitric oxide during sepsis.** Crit Care Med 28, 2161-2.

Groh V., Rhinehart R., Randolph-Habecker J., Topp M. S., Riddell S. R., Spies T. (2001) **Costimulation of CD8 $\alpha$ beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells.** Nat Immunol 2, 255-260

Grundmann U, Rensing H, Adams HA, Falk S, Wendler O, Ebinger N, Bauer M (2000) **Endotoxin desensitization of human mononuclear cells after cardiopulmonary bypass: role of humoral factors.** Anesthesiology 93, 359–369

Guha M, Mackman N. (2001) **LPS induction of gene expression in human monocytes.** Cell Signal. 13, 85–94

Guicciardi M. A., Leist M., Gores G. J. (2004) **Lysosomes in cell death.** Oncogene 23, 2881-2890



## H

Hack C. D., Aarden L. A., Thijs L. G. (1997) **Role of cytokines in sepsis.** Adv Immunol 66, 101-195

Hashimoto T., Hashimoto S., Hori Y., Nakagawa H., Hosokawa T. (1995) **Epidural anesthesia blocks changes in peripheral lymphocytes subpopulation during gastrectomy for stomach cancer.** Acta Anaesthesiol Scand 39, 294-298

Haslett C., Guthrie L.A., Kopaniak M.M., Johnston R.B., Henson P.M. (1985) **Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace contamination of bacterial lipopolysaccharide.** Am J Pathol 119, 101-110,

Helmy S. A., Wahby M. A., El-Nawaway M. (1999) **The effect of anaesthesia and surgery on plasma cytokine production.** Anaesthesia 54, 733-8

Hengartner M. O. (2000) **The biochemistry of apoptosis.** Nature 407, 770–776

Hofbauer R., Kaye A. D., Kapiotis S., Frass M. (1999) **The immune system and the effects of non-volatile anesthetics on neutrophil transmigration through endothelial cell monolayers.** Curr Pharm Des 5, 1015-1027

Hoff G., I. Bauer, B. Larsen, M. Bauer (2001). **Modulation of endotoxin-stimulated TNF-alpha gene expression by ketamine and propofol in cultured human whole blood.** Anaesthesist 50, 494-499, Springer Verlag

Hoffmann J. A., Kafatos K. C., Janeway C. A. (1999) **Phylogenetic perspectives in innate immunity.** Science 284, 1313-1318

Hofstetter C., Boost K.A., Flondor M. et al.(2007) **Anti-inflammatory effects of sevoflurane and mild hypothermia in endotoxemic rats.** Acta Anaesthesiol Scand 51, 893–9

Hogevold H. E., Lyberg T., Kahler H., Haug E., Reikeras O. (2000) **Changes in plasma IL-1beta, TNF-alpha, and IL-6 after total hip replacement surgery in general or regional anaesthesia.** Cytokine 12, 1156-1159

Hole A., Unsgaard G., Breivik H. (1982) **Monocyte functions are depressed during and after surgery under general anaesthesia but not under epidural anaesthesia.** Acta Anaesthesiol Scand 26, 301-307

Hole A., Unsgaard G. (1983) **The effect of epidural and general anaesthesia on lymphocyte functions during and after major orthopaedic surgery.** Acta Anaesthesiol Scand 27, 135-141

Horton J. W., Walker P. B. (1993) **Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion.** J Appl Physiol 74, 1515-1520

Hotchkiss R. S., et al. (1999) **Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock and multiple organ dysfunction.** Crit. Care Med 27, 1230-1251

Hotchkiss R. S., et al., (2001) **Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4<sup>+</sup> T-Lymphocytes in humans.** J. Immunol.166, 6952-6963

Hotchkiss R. S., Karl I. E. (2003) **The pathophysiology and treatment of sepsis.**  
N Engl J Med 348, 138-150

Hotchkiss R. S., Swanson P. E., Freeman B. D., Tinsley K. W., Cobb J. P., Matuschak G. M., Buchman T. G., Karl, I. E. (1999) **Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock and multiple organ dysfunction.** Crit. Care Med. 27, 1230–1251

Hudson L. D., Milberg J. A., Anardi D., Maunder R. J. (1995) **Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome.** Am J Respir Crit Care Med 151, 293-301

Huang Ping Yu, Ping Wing Lui, Tsann Long Hwang, Chia Hung Yen, Ying Tung Lau (2006) **Propofol improves endothelial dysfunction and attenuates vascular superoxide in septic rats.** Crit Care Med Vol.34, No.2

## I

Ibelgaufts H. (1991) **Lexikon der Zytokine.** Roche, Weinheim, 225-228, ISBN 3-923866-46-1

## J

Jäättelä M, (2004) **Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression.** Oncogene 23, 2746-2756

Janeway C.A. Jr., Medzhitov R., (1998), **Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response.** Semine. Immunol. 10, 349-350

Janeway CA Jr, Medzhitov R., (2002) **Innate immune recognition.**  
Annu Rev Immunol. 20, 197-216

Jansson J. R., Fukada T., Ozaki M., Kimura S. (2006) **Propofol EDTA and reduced incidence of infection.** Anaesthesia & Intensive Care 34(3), 362-8

Jensen A.G., Dahlgren C., Eintrei C. (1993) **Propofol decreases random and chemotactic stimulated locomotion of human neutrophils in vitro.** Br. J. Anaesth. 70, 99-100

Jensen R. H., Storgaard M., Vedelsdal E., Obel M. (1995) **Impaired neutrophil chemotaxis after cardiac surgery.** Scand J Thorac Cardiovasc Surg 29, 115-118

John C., Marshall, (2005) **Neutrophils in the pathogenesis of sepsis,** Crit Care med Vol.33, No 12 (Suppl.)

## K

Kågedal K., Zhao M., Svensson I., Brunk, U. T. (2001) **Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases.** Biochem. J. 359, 335-343

Kang TM. (2002) **Propofol infusion syndrome in critically ill patients.**  
Ann Pharmacother 36, 1453-6

Kapral Ch., Buder R., Binder M., Csillag Ch., Firlinger F., Gegenhuber A., Überall B., Wewalka F., Lenz K. (2005) **Leberversagen bei Sepsis und Multiorganversagen.** J. Gastroenterol. Hepatol. ERKR 2

- Kawasaki C., Kawasaki T., Ogata M., Nandate K., Shigematsu A. (2001) **Ketamine isomers suppress superantigen-induced proinflammatory cytokine production in human whole blood.** Can J Anaesth 48, 819-23
- Kawano T., Oshita s., Takahashi A. et al. (2005) **Molecular mechanisms underlying ketamine-mediated inhibition of sarcolemmal adenosine triphosphate- sensitive potassium channels.** Anaesthesiology 102, 93-101
- Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972) **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** Br. J. Cancer 26, 239–257
- Kelliher, M.A., S. Grimm, Y. Ishida, F. Kuo, B.Z. Stanger, and P. Leder. (1998) **The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal,** Immunity 8, 297-303
- Kenyon C. J., Young J., Gray C. E., Fraser R. (1984) **Inhibition by etomidate of steroidogenesis in isolated bovine adrenal cells.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 58, 947-949
- Kimoto M., Nagasawa K., Miyake K., (2003) **Role of TLR4/MD-2 and RP105/MD-1 in innate recognition of lipopolysaccharide.** Scand.J.Infect.Dis., 35, 568-572
- Kinley J (1996) **Neutrophils.** Arctic, New York, 1. Aufl., S. 2-4, 149-222
- Klepstad P., Maurset A., Moberg E. R., Oye I. (1990) **Evidence of a role for NMDA receptors in pain perception.** Eur J Pharmacol 187, 513-518
- Klava A., Windsor A. C., Farmery S. M., Woodhouse L. F., Reynolds J. V., Ramsden C. W., Boylston A. W., Guillou P. J. (1997) **Interleukin-10: a role in the development of postoperative immunosuppression.** Arch Surg 132, 425-429
- Knibbe C. A., Aarts L. P., Kuks P. F., Voortman H. J., Lie A. H. L., Bras L. J., Danhof M. (2000) **Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol 6% SAZN versus propofol 1% SAZN and Diprivan-10 for shortterm sedation following coronary artery bypass surgery.** Eur J Clin Pharmacol 56, 89-95
- Knight J. C., Udalova I., Hill A. V., Greenwood B. M., Peshu N., Marsh K., Kwiatkowski D. (1999) **A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria.** Nat Genet 22, 145-150
- Koseki, T., N. Inohara, S. Chen, R. Carrio, J. Merino, M.O. Hottiger, G.J. Nabel, and G. Nunez. 1999. **CIPER, a novel NF kappaB-activating protein containing a caspase recruitment domain with homology to Herpesvirus-2 protein E10**  
J Biol Chem., 274, 9955-61
- Kress H. G., Eberlein T. (1992) **Effect of anesthesia and operation on essential immune functions.** Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther. 27, 393-402.
- Kress H. G. (1994) **NMDA- und Opiatrezeptor-unabhängige Wirkungen von Ketamin.** Anaesthesist 43 [Suppl 2], S15-24
- Kress H. G. (1997) **Wirkmechanismen von Ketamin.** Anaesthesist 46[Suppl 1], S8-19
- Krieger M. (1997) **The other side of scavenger receptors: pattern recognition for**

**host defense.** Curr Opin Lipidol. 8, 275-280

Krieger M, Acton S, Ashkenas J, Pearson A, Penman M, Resnick D. (1993) **Molecular flypaper, host defense, and atherosclerosis.** J Biol Chem. 268,4569-4572

Kruidenier L., Verspaget H. W. (2002) **Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease – radicals or ridiculous?** Aliment Pharmacol Ther 16, 1997-2015

Krumholz W., Demel C., Jung S., Menthén G., Knecht J., Hempelmann G. (1995) **The effect of thiopentone, etomidate, ketamine and midazolam on several bactericidal functions of tumor necrosis factor-alpha by human fetal Kupffer cells.** Eur. J. Anaesth. 12, 141-146

Krumholz W., Endrass J., Hempelmann G. (1994) **Propofol inhibits phagocytosis of Staphylococcus aureus and Escherichia coli by polymorphonuclear leukocytes in vitro.** Can. J. Anaesth. 41, 446-449

Ksontini R, MacKay SL, Moldawer LL. (1998) **Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation.** Arch Surg 133(5), 558-567

Kutteh W.H., Rainey W.E., Carr B. R. (1991) **Glucocorticoids inhibit lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor-alpha by human fetal Kupffer cells.** J Clin Endocrinol Metab 73, 296-301

## L

Landmann R. et al., (1995) **Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in Gram negative septic shock.** J. Infect. Dis. 171, 639-644

Lange M., Bröking K., van Aken H., Hecklenbruch C., Bone H. G., Westphal M. (2006) **Einsatz von Ketamin bei sepsis und systemischen Entzündungsreaktionen.** Anaesthesist 55, 883-891

Larsen B., Hoff G., Wilhelm W. et al. (1998) **Effect of intravenous anesthetics on spontaneous and endotoxin-stimulated cytokine response in cultured human whole blood.** Anesthesiology 89, 1218-27

Lavoie J.N., Nguyen M., Marcellus R. C., Branton P. E., and Shore G. C. (1998) **E4orf4, a novel adenovirus death factor that induces p53-independent apoptosis by a pathway that is not inhibited by zVAD-fmk.** J. Cell Biol. 140, 637-645

Lavole P. M., Thibodeau J., Erard F., Sekaly R. P., (1999) **Understanding the mechanism of action of bacterial superantigens from a decade of research.** Immunol. Rev. 168, 257-269

Le Cras A. E., Galley H. F., Webster N. R. (1998) **Spinal but not general anesthesia increases the ratio of T helper 1 to T helper 2 cell subsets in patients undergoing transurethral resection of the prostate.** Anesthesia and Analgesia 87, 1421-5

Ledingham I. M., Watt I. (1983) **Influence of sedation on mortality in critically ill multiple trauma patients.** Lancet 1, 1270-1275

Ledowski Th., Bein B., Hanss R., Paris A., Fudickar W., Scholz J., Tonner P. H. (2005) **Neuroendocrine Stress Response and Heart Rate Variability: A Comparison of Total Intravenous Versus Balanced Anesthesia.** *Anesth Analg* 101, 1700-5

Leist M., Jaattela M., (2001) **Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598

Licker M., Spiliopoulos A., Tschopp J.M., (2003) **Influence of thoracic epidural analgesia on cardiovascular autonomic control after thoracic surgery,** *Anästhesist* 91, 525-31

Li P. et al., (1997) **Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.** *Cell* 91, 479–489

Lin RY, Astiz ME, Saxon JC, et al., (1993) **Altered leukocyte immunophenotypes in septic shock: Studies of HLA-DR, CD11b, CD14, and IL-2R expression** *Chest* 04, 847–853

Lippmann Maurice, Kakazu Clinton (2006) **Hemodynamics with Propofol: Is Propofol Dangerous in Classes III-V Patients?** *Anaesth. Analg.* Vol. 103, 260

Liu J, Durrant D, Lee RM. (2003) **Protein kinase C- $\gamma$  and its downstream effectors as potential targets for cancer therapy.** *Cancer Therapy* 1, 289–95.

Loop T (2003) **Molekulare Mechanismen der Immunmodulation durch Anästhetika.** *Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung.* Ausgabe 3-2003

Los M., Neubüser D., Mozoluk M., Poutska A., Coy J.F., Schulze-Osthoff K., (2000) **Molecular characterization of Dnase X, a novel apoptotic endonuclease expressed in muscle cells.** *Biochemistry* 39, 7365-7373

Lundy P. M., Lockwood P. A., Thompson G., Frew R. (1986) **Differential effects of ketamine isomers on neuronal and extraneuronal catecholamine uptake mechanisms.** *Anaesthesiology* 64, 359-363

## M

MacFie J., O'Boyle C., Mitchell C. J., Buckley P. M., Johnstone D., Sudworth P. (1999) **Gut origin of sepsis: a prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity.** *Gut* 45, 223-8

Mack V. E., McCarter M. D., Naama H. A., Calvano S. E., Daly J. M. (1996) **Dominance of Thelper 2-type cytokines after severe injury.** *Arch Surg* 131, 1303-1309

Mahieu P., Malaise M., De Groote D., Louis R., Belaiche J. (1998) **Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans.** *Clin Exp Immunol* 113, 401-406

Mahidhara R., Billiar T. (2000) **Apoptosis in sepsis.** *Crit. Care Med.* 28, N105–N113

Majcherczyk P. et al., (1999) **Digestion of Streptococcus pneumoniae cell walls with its major peptidoglycan hydrolase releases branched stem peptides carrying proinflammatory activity.** *J. Biol. Chem.* 27, 12537-12543

- Marasco W, Phan SH, Kruttsch H et al. (1984) **Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by Escherichia coli.** J Biol Chem 259, 5430-9
- Marana E., Annetta M. G., Meo F. et al. (2003) **Sevoflurane improves the neuroendocrine stress response during laparoscopic pelvic surgery.** Canadian Journal of Anaesthesia 50, 348-54
- Marana E. Scambia G. Maussier ML. Parpaglion R. Ferrandina G. Meo F. Sciarra M. Marana R. (2003) **Neuroendocrine stress response in patients undergoing benign ovarian cyst surgery by laparoscopy, minilaparotomy, and laparotomy.** Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists. 10(2),159-65
- Marchant A., Alegre M. L., Hakim A., et al. (1995) **Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock.** J Clin Immunol 15, 266±273
- Marshall J. C., Christou N. V., Meakins J.L. (1993) **The gastrointestinal tract. The undrained abscess of multiple organ failure.** Ann Surg 218(2), 111-119
- Martinou J.C., Green D. R., (2001) **Breaking the mitochondrial barrier.** Nat Rev Mol Cell Biol 2, 63–67
- Mathiasen I.S., Lademann U., and Jäättelä M. (1999) **Apoptosis induced by vitamin D compounds in breast cancer cells is inhibited by Bcl-2 but does not involve known caspases or p53.** Cancer Res. 59, 4848-4856
- Matsuki A., Ishihara H., Kotani N., Sakai T., Hirota K., Muraoka M., Hashimoto H., Tsubo T., Takahashi S., Koh H., Wakayama S., Sato Y., Nagao H. (2002) **A clinical study of total intravenous anesthesia by using mainly propofol, fentanyl and ketamine-with special reference to its safety based on 26,079 cases.** Masui 51, 1336-1342.
- Matute-Bello G, Liles W, (1997) **Neutrophil apoptosis in acute respiratory distress syndrome,** Am Rev Respir Crit Care Med 156, 1969-1977
- Mc Guirk P., Mills K. H. (2002) **Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the TH1/TH2 paradigm in immunity to infectious diseases.** Trends Immunol 23(9), 450-455
- Meakins J. L., Pietsch J. B., Bubenick O., Kelly R., Rode H., Gordon J., MacLean L. D. (1977) **Delayed hypersensitivity: indicator of acquired failure of host defenses in sepsis and trauma,** Ann. Surg. 186, 241–250
- Medzhitov R, Janeway C Jr., (2000) **Innate immunity.** N Engl J Med. 343, 338–344.
- Menzebach a., Hirsch J., Nöst R., Mogk M., Hempelmann G., Welters I.D. (2004) **Morphin hemmt die Expression von Komplementrezeptoren sowie Phagozytose und Oxidativen Burst in Monozyten über einen NO-abhängigen Mechanismus.** Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther: 39 204-211
- Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA et al. (1988) **Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration.** N Engl J Med 318(23), 1481-1486



Middleton G., Reid L. E., Harmon B. V. (1994) **Apoptosis in the human thymus in sudden and delayed death.** Pathology 26, 81–89.

Millet I., Ruddle N. (1997) **Lymphotoxin, Cytokines in health and disease.** Dekker, New York Basel, pp241-250

Molina P.E., Zambell K.L., Zhang P., Vande Stouwe C., Carnal J. (2004) **Hemodynamic and immune consequences of opiate analgesia after trauma/hemorrhage.** Shock. 21, 526-534

Molvig J., Pociot F., Worsaae H., Wogensen L. D., Baek L., Christensen P., Mandrup-Poulsen T., Andersen K., Madsen P., Dyerberg J., et al. (1991) **Dietary supplementation with omega-3-polyunsaturated fatty acids decreases mononuclear cell proliferation and interleukin-1b content but not monokine secretion in healthy and insulin-dependent diabetic individuals.** Scand J Immunol 34, 399-410

Morath S., Geyer A., Hartung T., (2001) **Structure- function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus.** J. Exp. Med. 193, 393-397

Moretti R. J., Hassan S. Z., Goodman L. I., Meltzer H. Y. (1984) **Comparison of ketamine and thiopental in healthy volunteers: effects on mental status, mood, and personality.** Anesth. Analg. 63, 1087-1096

Moudgil G. C., Allan R. B., Russel R. J., Wilkinson P. C. (1977) **Inhibition, by anaesthetic agents, of human leukocyte locomotion towards chemical attractants.** Br J Anaesth 49, 97

Muñoz C, Carlet J, Fitting C, et al., (1991) **Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis,** J Clin Invest 88, 1747–1754

Muhling J., Campos M.E., Sablotzki A., Krull M., Dehne M.G., Gonther J., Weiss S., Fuchs M., Hempelmann G. (2002) **Effects of propofol and taurine on intracellular free amino acid profiles and immune function markers in neutrophils in vitro.** Clin Chem Lab Med. 40, 111-121

Murphy P. G., Myers D. S., Davies M. J., Webster N. R., Jones J. G. (1992) **The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropylphenol).** Br J Anaesth 68, 613-618

Murphy M. P., Packer M. A., Scarlett J. L., Martin S. W. (1998) **Peroxynitrite – a biologically significant oxidant.** Gen Pharmacol 31, 179-86.

Murphy P.G., Ogilvy A.J., Whiteley S.M. (1996) **The effect of propofol on the neutrophil respiratory burst.** Europ. J. Of Anaesthesiology, 13(5), 471-3

Muzio M, Natoli G, Sacconi S, Levrero M, Mantovani A. **The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor  $\kappa$ B and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6).** J Exp Med. 87, 2097–2101

## N

Naaber P., Smidt I., Tamme K., Liigant A., Tapfer H., Mikelsaar M., Talvik R. (2000) **Translocation of indigenous microflora in an experimental model of sepsis.** J Med Microbiol 49, 431-439

Nadel S., Newport M. J., Booy R., Levin M. (1996) **Variation in the tumor necrosis factor- $\alpha$  gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease.** J Infect Dis 174, 878-880

Nagai Y. et al., (2002) **Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution.** Nature Immunol. 3, 667-672

Nakagawa T., Zhu H., Morishima N., Li E., Yankner B. A., Yuan J. (2000) **Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ .** Nature 403, 98-103

Nylandsted J., Rohde M., Brand K., Bastholm L., Elling F., and Jäättelä M. (2000) **Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumorspecific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 7871-7876

## O

Oberholzer C., Oberholzer A., Clare-Salzler M., Moldawer L. L. (2001) **Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration.** FASEB J. 15, 879–892.

Ogawa K., Hirai M., Katsube T. et al. (2000) **Suppression of cellular immunity by surgical stress.** Surgery. 127(3), 329-336

Oyadomari S., Mori M. (2004) **Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress.** Cell Death Differ. 11, 381–389

## P

Papathanassoglou, E. D. E., Moynihan, J. A., McDermott, M. P., Ackerman, M. H. (2001) **Expression of Fas (CD95) and Fas ligand on peripheral blood mononuclear cells in critical illness and association with multiorgan dysfunction severity and survival.,** Crit. Care Med. 29, 709–718

Parker S. D., Breslow M. J., Frank S. M. et al. (1995) **Catecholamine and cortisol responses to lower extremity revascularization. Correlation with outcome variables.** Crit Care Med 23,1954-61

Paxian M., Bauer M., Rensing H. et al. (2003) **Recovery of hepatocellular ATP and „pericentral apoptosis“ after hemorrhage and resuscitation.** FASEB J 17(9), 993-1002

Pena L., Fuks Z., Kolesnick R. (1997) **Stress induced apoptosis and the sphingomyelin pathway,** Biochem Pharmacol 53, 615-612

Pearson AM. (1996) **Scavenger receptors in innate immunity.** Curr Opin Immunol. 8, 20–28

Pietsch J. B., Meakins J. L., MacLean L. D. (1977) **The delayed hypersensitivity response: application in clinical surgery.** Surgery 82, 349–355.

Pinsky M. R., Vincent J. L., Deviere J., Alegre M., Kahn R. J., Dupont E. (1993) **Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality.** Chest 103, 565



Pulido E. J., Shames B. D., Pennica D., O'Leary R. M., Bensard D. D., Cain B. S. et al. (1999) **Cardiotrophin-1 Attenuates Endotoxin-Induced Acute Lung Injury.** J Surg Res 84, 240-6

## R

Ramus G. V., Cesano L., Barbalonga A.(1983) **Different concentrations of local anaesthetics have different modes of action on human lymphocytes.** Agents Actions 13, 333-341

Reich D., Hossain S., Krol M. et al. (2005) **Predictors of hypotension after induction of general anesthesia.** Anesth. Analg. 101, 622- 8

Reinhart K, Brunkhorst F.M., Bone H.G. et al. (2010) **Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. Erste Revision der S2k-Leitlinien der Deutschen Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin. (DIVI).**Anaesthesist 59, 347-370

Rem J., Kehlet H., Brandt M.R. (1980) **Prevention of postoperative lymphopenia and granulocytosis by epidural analgesia.** Lancet, 283-285

Rensing H. (2003) **Endotoxin- Pathogenetische Bedeutung bei der Sepsis** Anaesthesist (Suppl.1) 52:S 7–S 13 DOI 10.1007/s00101-003-0587-7

Reutershan J., Chang D., Hayes J.K., Ley K. (2006) **Protective effects of isoflurane pretreatment in endotoxin-induced lung injury.** Anesthesiology 104, 511–7

Riedemann N. C., Guo R. F., Ward P. A. (2003) **The enigma of sepsis.** J. Clin. Invest. 112(4), 460-467

Robenek, H. **Mikroskopie in Forschung und Praxis.** GIT Verlag, 1995

Roytblat L., Talmor D., Rachinsky M. et al. (1998) **Ketamine attenuates the interleukin-6 response after cardiopulmonary bypass.** Aesth Analg 87, 266-271

Rodriguez J., Lazebnik Y., (1999) **Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme.** Genes Dev. 13, 3179–3184

Rosenzweig S.D, Holland S.M, (2004) **Phagocyte immunodeficiencies and their infections,** J Allergy Clin Immunol 113, 620–626

Rossano F., Tufano R., Cipollaro De Lèro G., Servillo G., Baroni A., Tufano M.A. (1992) **Anaesthetic agents induce human mononuclear leukocytes to release cytokines.** Immunopharm Immunotoxicol 14, 439-450

Rost F. W. D , **Fluorescence microscopy**, Bd. 1, Cambridge University Press,Cambridge, 1992

Roth, G., Moser, B., Krenn, C., Brunner, M., Haisjackl, M., Almer, G., Wolner, E., Boltz-Nitulescu, G., Ankersmit, H. J. (2003) **Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes of septic patients: a mechanism of lymphopenia and Th2 predominance.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 308, 840–846.

Rothe, M., S.C. Wong, W.J. Henzel, and D.V. Goeddel (1994) **A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor,** Cell. 78:681-92

Runkel N. S. F., Moody F. G. , Smith G. S., Rodriguez L. F., LaRocco M. T., Miller T. A. (1991) **The role of the gut in the development of sepsis in acute pancreatitis.** J Surg Res 51, 18-23

## S

Schütt C. (2004) **Grundlagen der Immunologie für den praktischen Arzt.** Tägk. Prax. 45, 39-60  
Schüttler J. (1992) **Beginn einer neuen Ketamin-Ära.** Anaesthesist 41, 585-587

Schulze Osthoff K., Krammer P. H., Dröge W., (1994b) **Divergent signaling via APO-1/ Fas and TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death.** EMBO Journal 13, 4587-4596

Schuster H.-P., K. Werdan (Hrsg.), 2000 **Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen, Springer**, 3.vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage

Schuster H.-P., Müller-Werdan U. (2005) **Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen in Sepsis und MODS**, Springer Berlin Heidelberg ISBN 978-3-540-00004-4

Schmauder-Chock EA, Chock SP, Patchen ML (1994) **Ultrastructural localization of tumour necrosis factor-alpha** Histochem J 1994; 26, 142-151

Schmidt C., Steinke T., Moritz S., Graf B. M., Bucher M. (2010) **Akutes Nierenversagen und Sepsis Nur eine Organdysfunktion bei septischem Nierenversagen.** Anästhesist 59, 682-699

Schwall B., Jakob W., Sessler D. I., Taeger K., Frohlich D. (2000) **Less adrenergic activation during cataract surgery with total intravenous than with local anesthesia.** Acta Anaesthesiologica Scandinavica 44, 343-7

Schwartz R. S. (2003) **Shattuck lecture: Diversity of the immune repertoire and immunoregulation.** N Engl J Med 348, 1017-1026

Seydel U., Oikawa M., Fukase K., Kusumoto S, Brandenburg K., (2000) **Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity.** Eur. J. Biochem. 267, 3002-3039

Shaked G., Czeiger D., Dukhno O., Levy I., Artru A. A., Shapira Y., Douvdevani A. (2004) **Ketamin improves survival and suppress IL6 and TNFalpha production in a model of Gram-negative bacterial sepsis in rats.** Resuscitation 62(2), 237-42

Sheeran P., Hall G. M. (1997) **Cytokines in anaesthesia.** Br J Anaesth 78, 201-219

Shimaoka M., Iida T., Ohara A., Taenaka N., Mashimo T., Honda T., Yoshiya I. (1996) **Ketamine inhibits nitric oxide production in mouse-activated macrophage-like cells.** Br J Anaesth 77, 238-42

Shimaoka M., Hosotsubo K., Sugimoto M. et al. (1998) **The influence of surgical stress on T cells: enhancement of early phase lymphocyte activation.** Anesth Analg. 87, 1431-1435

Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., Kimoto M. (1999) **MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.** J.Exp.Med., 189, 1777-1782

- Sibanda S., Hughes JM., Pawson PE., Kelly G., Bellenger C. R. (2006) **The effects of preoperative extradural bupivacaine and morphine on the stress response in dogs undergoing femoro-tibial joint surgery.** *Veterinary Anaesthesia & Analgesia*. 33(4),246-57
- Sinciain R., Eriksson A. S., Gretzer G., Cassuto J., Thomsen P. (1993) **Inhibitory effects of amide local anaesthetics on stimulus-induced human leukocyte metabolic activation, LTB<sub>4</sub> release and IL-1 secretion in vitro.** *Acta Anaesthesiol Scand* 37, 159-165
- Somri M, Gaitini LA, Vaida SJ et al. (2002) **Effect of ilioinguinal nerve block on the catecholamine plasma levels in orchidopexy: comparison with caudal epidural block.** *Paediatr Anaesth* 12, 791-797
- Sookhai S., Wang J. J., McCourt M., Kirwan W., Bouchier-Hayes D., Redmond P. (2002) **A novel therapeutic strategy for attenuating neutrophil-mediated lung injury in vivo.** *Ann. Surg.* 235, 285-291
- Srinivasula, S.M., M. Ahmad, J.H. Lin, J.L. Poyet, T. Fernandes-Alnemri, P.N. Tsichlis, and E.S. Alnemri. (1999) **CLAP, a novel caspase recruitment domain-containing protein in the tumor necrosis factor receptor pathway, regulates NF-kappaB activation and apoptosis,** *J Biol Chem*. 274, 17946-54
- Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, et al., (1994) **Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome,** *Am J Respir Crit Care Med* 150, 113-122
- Steurer M., Schl pfer M., Rothh Z'graggen B., Booy C., Sphan D.R., Beck-Schimmer B. (2009) **The volatile anaesthetic sevoflurane attenuates lipopolysaccharide-induced injury in alveolar macrophages.** *Clin Exp Immunol*. 155(2), 224–230
- Stockmann C., Fandrey J., (2006) **Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression.** *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33(10),968-79
- Stossel TP.(1989) **From signal to pseudopod.** *J Biol Chem* 264, 18261-4
- Stossel TP. (1994) **The machinery of blood cell movement.** *Blood* 84, 367-79.
- Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. (1996) **A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis .** *Crit Care Med* 24(3), 381-384
- St ber A. (2001) **Effects of genomic polymorphisms on the course of sepsis: is there a concept for gene therapy?** *Am Soc Nephrol* 12 [Suppl 17], S60-64
- Suliburk James W., Gonzalez Ernest A., Kennison Sasha D., Helmer Kenneth S., Mercer David W. (2005) **Differential Effects of Anesthetics on Endotoxin-Induced Liver Injury.** *J Trauma*. 58, 711–717
- Suter D., Spahn D.R., Blumenthal S. et al.(2007) **The immunomodulatory effect of sevoflurane in endotoxin-injured alveolar epithelial cells.** *Anesth Analg* 104, 638–45.

## T

- Takeuchi O. et al., (1999) **Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components.** Immunity 11,443-451
- Tan LR, Waxman K, Scannell G, Ioli G, Granger GA. (1993) **Trauma causes early release of soluble receptors for tumor necrosis factor.** J Trauma 34(5), 634-638
- Taneja R, Parodo J, Kapus A, et al., (2004) **Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity.** Crit Care Med 32, 1460-1469
- Tang G. J., Huang S. L., Yien H. W., Chen W. S., Chi C. W., Wu C. W., Lui W. Y., Chiu J. H., Lee T. Y. (2000) **Tumor necrosis factor gene polymorphism and septic shock in surgical infection.** Crit Care Med 28, 2733-2736
- Taniguchi T., Yamamoto K., Ohmoto N., Ohta K., Kobayashi T. (2000) **Effects of propofol on hemodynamic and inflammatory responses to endotoxemia in rats.** Crit Care Med 28, 1101-6
- Testi R. (1996), **Sphingomyelin breakdown and cell fate.** TIBS 21, 468-471
- Teyin E., Derbent A., Balcioglu T., Cokmez B. (2006) **The efficacy of caudal morphine or bupivacaine combined with general anesthesia on postoperative pain and neuroendocrine stress response in children.** Pediatric Anesthesia 16, 290-296
- Theilen H. J., Adam S., Albrecht M. D., Ragaller M. (2002) **Propofol in a medium- and long-chain triglyceride emulsion: pharmacological characteristics and potential beneficial effects.** Anesth Analg 95, 923-929
- Thepen T., Kraal G., Holt P. G. (1994) **The role of alveolar macrophages in regulation of lung inflammation.** Ann N Y Acad Sci 725, 200-206
- Thompson P.A., Tobias P.S., Viriyakosol S., Kirkland T.N., Kitchens R.L. (2003) **Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein inhibits responses to cellbound LPS.** J.Biol.Chem., 278, 28367-28371
- Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW et al. (1986) **Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin.** Science 234(4775), 470-474
- Tonneson E., Wahlgreen C. (1988) **Influence of extradural and general anaesthesia on natural killer cell activity and lymphocyte subpopulations in patients undergoing hysterectomy.** Br J Anaesth 60, 500-507
- Toyokuni S. (1999) **Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology.** Pathol Int 49, 91-102.
- Tran D. D., Cuesta M. A., van Leeuwen P. A. , Nauta J. J., Wesdorp R. I. (1993) **Risk factors for multiple organ system failure and death in critically injured patients.** Surgery 114, 21-30
- Tsao, D.H., T. McDonagh, J.B. Telliez, S. Hsu, K. Malakian, G.Y. Xu, and L.L. Lin (2000) **Solution structure of N-TRADD and characterization of the interaction of NTRADD and C-TRAF2, a key step in the TNFR1 signaling pathway.** Mol Cell. 5, 1051-7

## V

- Van der P. T., Lowry S. F. (1995) **Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense?** Shock 3(1),1-12
- Van der Poll T., Coyle S. M., Barbosa K., Braxton C. C., Lowry S. F. (1996) **Epinephrine inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia.** J Clin Invest 97, 713-719
- Van der Poll T., Jansen J., Endert E., Sauerwein H.P., van Deventer S. J. H. (1994) **Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide- induced Tumor Necrosis Factor and Interleukin 6 production in humane whole blood.** Infect Immun 62, 2046- 2050
- Van der Vliet A., Bast A.. (1992) **Role of reactive oxygen species in intestinal diseases.** Free Radic Biol Med 12, 499-513.
- Vandenabeele P., Declercq W., Beyaert R., Fiers W.(1995) **Two tumor necrosis factor receptors:structure and function.** Trends in Cell Biology 5, 392-399
- Vasile B., Rasulo F., Candiani A., Latronico N. (2003) **The pathophysiology of propofol infusion syndrom: a simple name for a complex syndrome.** Intensive Care Med 29,1417-25
- Vasselon T., Detmers P. A., (2002) **Toll receptors: a central element in innate immune responses.** Infect. Immun. 70, 1033
- Verhoven B; Schlegel RA; Williamson P, (1995) **Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes.** J Exp Med 182: 1597-601
- Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger, (1995) **A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.** J Immunol Methods. 184, 39-51
- Vincent J. L., Abraham E., Annane D. et al. (2002) **Reducing mortality in sepsis : new directions.** Crit Care 6 [Suppl 3] S1-18
- Viriyakosol S., Kirkland T., Soldau K., Tobias P., (2000) **MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide.** J.Endotoxin.Res. 6, 489-491.
- Volk H. D., Reinke P., Krausch D., Zuckermann H., Asadullah K., Muller J. M., Docke W. D., Kox W. J. (1996) **Monocyte deactivation- rationale for a new therapeutic strategy in sepsis.** Intensive Care Med 22 (Suppl 4), S474-481

## W

- Wallach D., Varfolomeev E. E., Malinin N. L., Goltsev Y. V., Kovalenko A.V., and Boldin M. P. (1999) **Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms.** Annu. Rev. Immunol. 17, 331-367
- Walton B. (1979) **Effects of anaesthesia and surgery on immune status.** Br J Anaesth 51, 37-43

- Wang J.E. et al., (2000) **Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL6) and IL10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model.** Infect. Immun. 68, 3965- 3970
- Wang X. D., Parsson H., Andersson R., Soltesz V., Johansson K., Bengmark S. (1994) **Bacterial translocation, intestinal ultrastructure and cell membrane permeability early after major liver resection in the rat.** Br J Surg 81, 579-584
- Ward D. S, Norton J. R., Guivarc'h P. H., Litman R. S., Bailey P. L. (2002) **Pharmacodynamics and pharmacokinetics of propofol in a medium-chain triglyceride emulsion.** Anesthesiology 97, 1401-1408
- Ware LB, Matthay MA, (2000) **The acute respiratory distress syndrome,** N Engl J Med 2000; 342, 1334-1349
- Weigand M. A., Schmidt H., Zhao Q., Plaschke K., Martin E., Bardenheuer H. J. (2000) **Ketamine modulates the stimulated adhesion molecule expression on human neutrophils in vitro.** Anesth Analg 90, 206-12
- Weissman C. (1990) **The metabolic response to stress. an overview and update.** Anesthesiology 73, 308–27
- Wesche D., Lomas-Neira J., Perl M., Chung C.-S., Alaya A.,(2005) **Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock,** Journal of Leukocyte Biology, Vol. 78
- Wesche-Soldato D., Lomas-Neira J., Perl M., Jones L., Chung C., Ayala A. (2005) **The role an regulation of apoptosis in sepsis.** Journal of Endotoxin Research 11, 375-382
- Westendorp R. G., Langermans J. A., Huizinga T. W., Verweij C. L., Sturk A. (1997) **Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease.** Lancet 349, 1912-1913
- White Owen C, Alexander J. W, Sramkoski R. M, Babcock GF (1992) **Rapid whole-blood microassay using flow cytometry for measuring neutrophil phagocytosis.** J Clin Microbiol 30, 2071-2076,
- Wilson A. G., Symons J. A., McDowell T. L., McDevitt H. O., Duff G. W. (1997) **Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor a promoter on transcriptional activation.** Proc Natl Acad Sci USA 94, 3195-3199
- White P. F., Ham J., Way W. L., Trevor A. J., (1980) **Pharmacology of ketamine isomers in surgical patients.** Anesthesiology 52, 231-239
- Wjst M (2004) **Target SNP selection in complex disease association studies.** BMC Bioinformatics 5, 92
- Wright SD. (1999) **Toll: a new piece in the puzzle of innate immunity.** J Exp Med. 89, 605–609.
- Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C. (1990) **CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.** Science, 249, 1431-1433
- Wunderink R. G., Waterer G. W., Cantor R. M., Quasney M. W. (2002) **Tumor necrosis factor gene polymorphisms and the variable presentation and outcome of community-acquired pneumonia.** Chest 121, 87S



Wyllie A. H. (1980) **Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.** Nature 284, 555-556

Wyllie A. H., Golstein P. (2001) **More than one way to go.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 11-13

Wyllie A. H., Kerr J. F., Currie A. R. (1980) **Cell death: the significance of apoptosis.** Int. Rev. Cytol. 68, 251-306

## X

Xu Y. X., Wichmann M. W., Ayala A., Cioffi W. G., Chaudry I. H. (1997) **Trauma-hemorrhage induces thymic apoptosis while decreasing IL-3 release and increasing GM-CSF.** J. Surg. Res. 68, 24-30

## Y

Yang J., Li W., Duan M., Zhou Z., Lin N., Wang Z., Sun J., Xu J. (2005) **Large dose ketamine inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats.** Inflamm. res. 54, 133-137

Yli-Hankala A., Kirvela M., Randell T., Lindgren L. (1992) **Ketamine anaesthesia in a patient with septic shock.** Acta Anaesthesiol Scand 36, 483-5

Yoshiaki T, Torti FM. (1992) **Tumor necrosis factor structure and function.** In: Kunkel SL, Rernick WG, editors. Cytokines in Health and Diseases. New York: Moral Dekker Int., 1992: 131-151

Yu Y., Zhou Z., Xu J., Liu Z., Wang Y. (2002) **Ketamine reduces NFκB activation and TNF-production in rat mononuclear cells induced by lipopolysaccharide in vitro.** Ann Clin Lab Sci 32, 292-8

Yue T., Roth Z'graggen B., Blumenthal S. et al. (2008) **Post-conditioning with a volatile anaesthetic in alveolar epithelial cells *in vitro*.** Eur Respir J 31, 118-25.

## Z

Zachowski A., Favre E., Cribier S., Herve, P., Devaux, P. F. (1986) **Outside-inside translocation of amino- phospholipids in human erythrocyte membrane is mediated by a specific enzyme.** Biochemistry 25, 2585-2590

Zeni F., Freeman B., Natason C. (1997) **Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment.** Crit Care Med 25, 1095-1100

Zielmann S., Kazmaier S., Schnull S., Weyland A. (1997) **S-(+)- Ketamin und Kreislauf.** Anaesthesist 46[Suppl 1] S43-46

Zilberstein G., Levy R., Rachinsky M., Fisher A., Greemberg L., Shapira Y., Appelbaum A., Roytblat L. (2002) **Ketamine attenuates neutrophil activation after cardiopulmonary bypass.** Anesth Analg 95, 531-6

Zou H., Henzel W. J., Liu X., Lutschg A., Wang X., (1997) **Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3.** Cell 90, 405-413



## VII. Danksagung

Im Folgenden möchte ich all denjenigen danken, ohne deren Unterstützung und Mithilfe die hier vorliegende Forschungsarbeit nicht zustande gekommen wäre.

Herrn Prof. Dr. med. M. Bauer danke ich für die Bereitstellung des Promotionsthemas und seine Unterstützung während der gesamten Bearbeitung.

Herrn Dr. rar. net. R. Claus, Dr. V. Oberle sowie dem gesamten Laborteam danke ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit im Forschungslabor der Klinik für experimentelle Anästhesie des Universitätsklinikums Jena.

Herrn Dr. med. A. Kortgen danke ich besonders für die Beratung bei jeglicher Art von statistischen Fragen und Problemen, sowie seine stete Beratung und Mithilfe.

Frau Dr. med. G. Paxian danke ich für die Betreuung, Beratung und Mithilfe während der gesamten Bearbeitung dieser Forschungsarbeit.

Frau Dr. med. M. Masuch, meiner Mitdoktorantin danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit und Ihre zuverlässige Unterstützung, sowie die schöne Zeit im Labor.

## VIII. Lebenslauf

### PERSÖNLICHES

- Name: Susann Lindner (geb. Köhler)
- Anschrift: Geschwister- Scholl- Str. 70  
99085 Erfurt
- Geburtsdatum: 28.04.1981
- Geburtsort: Gera
- Familienstand: verheiratet
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Eltern: Helmut Köhler, Dipl. Geologe  
Heidemarie Köhler, Dipl. Betriebswirt

### AUSBILDUNG

- 09/1987 - 07/1990 Polytechnische Oberschule in Gera
- 09/1990 - 07/1999 Gymnasium in Gera
- 09/1999 - 09/2001 Ausbildung zur Zahnmedizinischen Assistentin in  
Wendelstein
- 10/2001 - 12/2007 Studium an der Friedrich-Schiller  
Universität in Jena  
Studiengang: Humanmedizin  
Physikum: 09/2003  
Approbation 12/2007
- 01/2008 – 09/2009 Ärztin in Weiterbildung Kinderchirurgie  
SRH Zentralklinikum Suhl
- seit 10/2009 Ärztin in Weiterbildung Kinderchirurgie/ Common  
Trunk, Helios Klinikum Erfurt

## **IX. Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass mir die Promotionsordnung der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind.

Folgende Personen haben mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt: Prof. Dr. med. M. Bauer, Dr. rar. net. R. Claus, Dr. V. Oberle, Dr. med. A. Kortgen, Dr. med. G. Paxian.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen. Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Erfurt, 2012

Unterschrift des Verfassers